

Aus dem Zentrum für Humangenetik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik

Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen

Leiterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg

GmbH,

Standort Marburg

**Mutationsanalysen in *BBS1* bei Patienten mit
Bardet-Biedl-Syndrom**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Julia Meyer geb. Kersten

aus Moers

Marburg, 2009

Aus dem Zentrum für Humangenetik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik

Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen

Leiterin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg

GmbH,

Standort Marburg

**Mutationsanalysen in *BBS1* bei Patienten mit
Bardet-Biedl-Syndrom**



Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Meyer geb. Kersten

aus Moers

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 28.05.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referentin: Prof. Dr. med. Manuela C. Koch

Correferent: Prof. Dr. med. S. Waldegger

Kapitel		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Geschichte und Epidemiologie des Bardet-Biedl-Syndroms	1
1.1.1	Klinische Merkmale des Bardet-Biedl-Syndroms	2
1.1.2	Pathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms	5
1.1.3	Die Gene <i>BBS1-12</i> und ihre Proteine	6
1.2	Mutationen im <i>BBS1</i>-Gen	8
1.3	Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms	10
1.4	Ziele und Fragestellung der Studie	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Enzyme, Fertigpuffer und Nukleinsäuren	14
2.1.3	Lösungen und Puffer	15
2.2	Geräte und Zubehör	16
2.3	Software	17
2.4	Experimentelle Methoden	18
2.4.1	DNA-Isolierung aus Blutleukozyten	18
2.4.1.1	DNA-Aufreinigung	18
2.4.1.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	18
2.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.4.3	Agarosegelelektrophorese	19
2.4.4	Genstruktur <i>BBS1</i>	20
2.4.5	Restriktionsspaltung mit <i>AvaII</i> zum Mutationsscreening	21
2.4.6	Genotypisierung der Punktmutation c.1169T→G in Exon 12 (p.M390R)	21
2.4.7	Oligonukleotide für <i>BBS1</i>	23
2.4.8	Single-strand conformational analysis (SSCA)	24
2.4.8.1	Färbung mit Silbernitrat	26
2.4.9	Sequenzierung von PCR-Produkten	26
2.4.9.1	Vorbereitung der Proben	27
2.4.9.2	Sequenzreaktion	27
2.4.9.3	Herstellung eines Sequenzgels	27
2.4.9.4	Sequenzanalyse	27

Kapitel		Seite
3.	Patienten	28
3.1	Patienten und Kontrollpersonen	29
3.2	Fragebogen zum Bardet-Biedl-Syndrom	30
3.3	Kasuistik des Patienten 2125 (Familie 2038)	32
3.3.1	Klinische Symptome des BBS bei Patient 2125	35
3.3.2	Molekulargenetische Analyse im <i>BBS1</i> - und <i>BBS6</i> -Gen bei Patient 2125	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Fragebogenauswertung im Blick auf die Hauptsymptome des BBS	37
4.1.1	Zusammenfassung der Fragebogenauswertung	41
4.2	Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen im <i>BBS1</i>-Gen	43
4.2.1	Genotyp- und Allelfrequenzen der Punktmutation c.1169T→G (p.M390R) bei BBS-Patienten und Kontrollpersonen	43
4.2.2	Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) im <i>BBS1</i> -Gen	44
4.2.3	Exon 4	45
4.2.4	Exon 5	46
4.2.5	Exon 8	47
4.2.6	Exon 10	47
4.2.7	Exon 12	48
4.2.8	Exon 13	51
4.2.9	Exon 15	52
4.2.10	Exon 16	52
4.2.11	Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse von <i>BBS1</i>	53
4.3	Sequenzanalysen im <i>BBS1</i>-Gen	54
4.3.1	Punktmutation c.238C→G in Exon 4 (p.S80G)	56
4.3.2	Punktmutation c.271A→C in Exon 4 (p.T91P)	57
4.3.3	Polymorphismus c.378G→A in Exon 4 (p.L126L)	58
4.3.4	Sequenzvarianten in Exon 4	59
4.3.5	Insertionspolymorphismus in Intron 5 (IVS5+32_32insC)	60
4.3.6	Punktmutation c.1169T→G in Exon 12 (p.M390R)	61
4.3.7	Mutationen im <i>BBS1</i> -Gen bei Familie 2032	62
4.3.7.1	Frameshift-Mutation c.1130_1134del in Ex 12 (C377_F378delfsX412)	62
4.3.7.2	Punktmutation c.1339G→A in Exon 13 (p.A447T)	63
4.3.8	Punktmutation c.1318C→T in Exon 13 (p.R440X)	65

Kapitel		Seite
5.	Diskussion	66
5.1	Fragebogen	66
5.1.1	Die klinischen Symptome des BBS im Vergleich zur Literatur	66
5.1.2	Geschlechterverteilung	66
5.1.3	Diagnosestellung	67
5.1.4	Konsanguinität in der Studie	71
5.2	Labormethoden	72
5.2.1	Die SSCA als Screeningmethode für Sequenzvarianten im Vergleich mit der direkten DNA-Sequenzanalyse	73
5.2.2	Methodisches Vorgehen in dieser Studie	75
5.3	Sequenzvarianten bei 51 Patienten im <i>BBS1</i>-Gen	76
5.3.1	Analyse der Patienten dieser Studie auf Sequenzvarianten in <i>BBS10</i>	79
5.4	Molekulargenetische Ergebnisse der 30 Patienten der Fragebogenstudie	80
5.5	Sequenzvarianten bei Familie 2033 und 2032	82
5.5.1	Familie 2033	82
5.5.2	Familie 2032	84
5.6	Vererbung des BBS und die Bedeutung für die humangenetische Beratung	85
5.7	Ausblick	87
6.	Zusammenfassung	88
7.	Abkürzungen und Symbole	90
7.1	Abkürzungen	90
7.2	Symbole	93
8.	Literaturverzeichnis	94
9.	Anhang	103
9.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	103
9.1.1	Philipps-Universität Marburg	103
9.1.2	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	103
9.2	Lebenslauf	104
9.3	Danksagung	105
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	106
9.4.1	Poster: <i>BBS1</i> and <i>BBS10</i> molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome	107

1. Einleitung

1.1 Geschichte und Epidemiologie des Bardet-Biedl-Syndroms

Die Ärzte John Z. Laurence (Diabetologe) und Robert C. Moon (Ophtalmologe) beschrieben 1866 in London eine Familie mit den Auffälligkeiten Adipositas, Retinitis pigmentosa und mentaler Retardierung. Es wurde kein weiterer derartiger Fall publiziert bis 1920 der Allgemeinmediziner George Bardet über zwei französische Mädchen berichtete, die die Trias Adipositas, Polydaktylie und Retinitis pigmentosa aufwiesen (Bardet 1920). Im Jahr 1922 veröffentlichte der österreichische Arzt und Endokrinologe Artur Biedl einen kurzen Fallbericht über zwei Geschwister mit Retinitis pigmentosa, Polydaktylie, Adipositas, Hypogenitalismus und intellektueller Minderbegabung (Biedl 1922).

Die Autoren S. Solis-Cohen und E. Weiss griffen diese Publikationen 1925 auf und fassten sie zu einem Syndrom zusammen, dem Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom (Solis-Cohen und Weiss 1925). Durch die Publikationen von Ammann im Jahr 1970 und Schachat und Maumenee im Jahr 1982 wurde die bis dahin bestehende Terminologie wieder geändert (Ammann et al. 1970, Schachat und Maumenee 1982). Die Autoren stellten Unterschiede zwischen den von Laurence und Moon und den von Bardet und Biedl beschriebenen Syndromen fest und trennten die Syndrome voneinander. Seither unterscheidet man das Bardet-Biedl-Syndrom von dem Laurence-Moon-Syndrom. Beide Syndrome werden autosomal-rezessiv vererbt.

Bei den nicht-blutsverwandten Populationen Nordeuropas und Nordamerikas variiert die Prävalenz des Bardet-Biedl-Syndroms von 1:100.000 in Nordamerika bis 1:160.000 in der Schweiz (Croft und Swift 1990, Klein und Ammann 1969). Eine höhere Prävalenz mit 1:13.500 findet man unter den beduinischen Völkern Kuwaits, bei denen häufig Konsanguinität besteht (Farag und Teebi 1989). In der neufundländischen Bevölkerung ist aufgrund eines Gründereffektes die Prävalenz mit 1:17.500 ebenfalls außergewöhnlich hoch (Green et al. 1989).

1.1.1 Klinische Merkmale des Bardet-Biedl-Syndroms (BBS)

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine autosomal-rezessiv vererbte und genetische heterogene Erkrankung, die in einer Kombination von verschiedenen Symptomen mit unterschiedlicher Schwere und Häufigkeit auftreten.

Zu den primären Symptomen zählen: Adipositas, postaxiale Polydaktylie, Retinitis pigmentosa, Hypogonadismus bei Männern und komplexe genitale Fehlbildungen bei Frauen, sowie renale Fehlbildungen und mentale Retardierung.

Zu den sekundären Symptomen gehören u.a. Sprachschwierigkeiten, Entwicklungsverzögerung, Syndaktylie, Astigmatismus, Diabetes mellitus, kardiale Auffälligkeiten, Lebererkrankungen und dentale Anomalien.

Beales und Mitarbeiter schlugen vor, das Vorhandensein von vier primären (Hauptkriterien) oder drei primären plus zwei sekundären Symptomen (Nebenkriterien) als diagnostische Kriterien festzulegen (Beales et al. 1999, 2001).

Tab. 1: Haupt- und Nebenkriterien des BBS-Syndroms nach Beales et al. 1999

Die prozentualen Häufigkeiten des Auftretens der Hauptsymptome sind in Klammern aufgeführt.

Hauptkriterien		Nebenkriterien
Polydaktylie	(90%)	Sprachverzögerung
Retinitis pigmentosa	(93%)	Entwicklungsverzögerung
Adipositas	(72-90%)	Koordinationsstörungen
Mentale Retardierung	(60%)	Schielen/Linsentrübung/Astigmatismus
Hypogonadismus beim Mann	(90%)	Anosmie
Nierenfehlbildungen	(90%)	Zahnstellungsanomalien
		Hyper-/Hypodontismus
		Brachydaktylie
		Syndaktylie
		Diabetes mellitus
		Diabetes insipidus
		Herzfehler
		Leberfunktionsstörungen

Hauptkriterien

Postaxiale Polydaktylie bezeichnet das Vorhandensein mindestens eines überzähligen Gliedes an der ulnaren Seite der Hand und/oder der fibularen Seite des Fußes. Am häufigsten findet sich eine postaxiale Hexadaktylie. Dazu kommt in einigen Fällen eine Brachydaktylie und nur selten eine Syndaktylie (David et al. 1999, Beales et al. 1997 und 1999, Rudling et al. 1996). Die Augenhintergrundsveränderungen treten in Form einer atypisch pigmentierten Retinadystrophie mit früher Makulabeteiligung auf (Amman et al. 1970, Bergsma und Brown 1975, Campo und Aaberg 1982). Eine frühzeitige Stäbchendegeneration führt zu Nachtblindheit und Röhrengesichtsfeld. Die Augenerkrankung wird durch die typischen Funduspigmentierungen, die Gesichtsfeldeinengung, die Nachtblindheit und das erloschene Elektroretinogramm diagnostiziert, welches bei den Patienten bereits ab dem 14. Lebensmonat auffällig sein kann (Runge et al. 1986). Gemäß der World Health Organisation (WHO) kann Adipositas definiert werden als ein Body Mass Index (BMI) größer als 30 oder größer als die 97. Perzentile. Während Neugeborene und Säuglinge mit BBS zumeist noch normalgewichtig sind, kommt es ab dem zweiten bis dritten Lebensjahr zu einer überproportionalen Gewichtszunahme. BBS-Patienten zeigen häufig eine stammbetonte Form der Adipositas.

Die beim BBS auftretenden Lernschwierigkeiten beruhen auf einer geistigen Entwicklungsverzögerung. Durch Untersuchungen von Green und Mitarbeitern im Jahr 1989 sowie Riise und Mitarbeitern 1997 konnten bei BBS-Patienten durchschnittliche IQ-Werte von 80 - 90 gemessen werden (Green et al. 1989, Riise et al. 1997). Die Werte lagen damit unter dem Durchschnitt der Allgemeinbevölkerung. Von Hypogonadismus und Infertilität sind vor allem die männlichen BBS-Patienten betroffen. Bei Männern wurden ein verkürzter Penis und/oder ein reduziertes Hodenvolumen diagnostiziert (Bell et al. 1958, Klein und Ammann 1969). Bei den weiblichen BBS-Patienten wurden komplexe genitale Fehlbildungen wie beispielsweise hypoplastische Eileiter, Uterus und Ovarien, eine Vaginalatresie, ein Uterus duplex oder ein persistierender Sinus urogenitalis gefunden (Klein und Amman 1969, Nadjmi et al. 1969, Campo und Aaberg 1982, Srinivas et al. 1983, Cramer et al. 1988, Green et al. 1989, Stoler et al. 1995, Mehrotra et al. 1997, Uguralp et al. 2003). Das Bardet-Biedl-Syndrom weist einige charakteristische, vielleicht auch schon pathognomonische Nephropathien auf. Dazu gehören tubulär-zystische Divertikel, eine Verklumpung des Nierenkelchsystems und die Persistenz der fetalen Lobulation (Klein und Ammann 1969, Nadjmi et al. 1969, Beales et al. 1999).

Nebenkriterien

Zu den Sprachschwierigkeiten beim BBS gehören z. B. Phonationsschwierigkeiten wie gehauchte, hohe Laute oder Disgrammatismus. Sie gehen häufig mit einer Verzögerung der Sprachentwicklung einher. Die Patienten entwickeln in vielen Fällen keine altersentsprechende Sprache vor dem vierten Lebensjahr (Garsteck et al. 1972, Beales et al. 1999). Viele Kinder mit Bardet-Biedl-Syndrom durchlaufen aufgrund von Störungen der Grob- und Feinmotorik die kindliche Entwicklung nur verzögert. Bei einem großen Prozentsatz der Patienten fällt ein hohes Maß an Ungeschicklichkeit und ein breitbeiniges Gangbild auf. Zusätzlich lässt sich gelegentlich eine Dysdiadochokinese feststellen.

Außer der Retinitis pigmentosa lassen sich beim BBS an ophthalmologischen Befunden Myopien, Astigmatismus und Katarakt finden. Im Jahr 2004 wurden erstmals unter BBS-Knockout-Mäusen Tiere mit partieller oder kompletter Anosmie beschrieben (Kulaga et al. 2004, Nishimura et al. 2004, Fath et al. 2005, Iannacone et al. 2005). Kulaga und Mitarbeiter konnten in einer Untersuchung an 19 BBS-Patienten zehn Patienten mit normalem Geruchssinn sowie zwei Patienten mit auffälligem und sieben Patienten mit fehlendem Geruchssinn finden (Kulaga et al. 2004). Bei mehreren BBS-Patienten wurden ungewöhnlich kurze Zahnwurzeln vor allem der unteren Schneidezähne sowie eine Zahnschmelzdysplasie festgestellt. Außerdem wurden in der Literatur Fälle beschrieben, bei denen Hypodontie, Zahnstellungsanomalien oder ein hoch gewölbter Gaumen vorlagen (Borgström et al. 1996).

Eine herabgesetzte Glukosetoleranz konnte bereits bei jüngeren BBS-Patienten vor der Manifestation eines nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM) festgestellt werden (Green et al. 1989). Im Allgemeinen scheint ein Diabetes mellitus beim Bardet-Biedl-Syndrom erst in der Adoleszenz oder im Erwachsenenalter aufzutreten. Der nephrogene Diabetes insipidus ist ein häufig übersehenes Symptom des BBS. Polyurie und Polydipsie können auch ohne das Vorhandensein sonstiger Nierenstrukturveränderungen auftreten.

Unter den kardialen Anomalien beim BBS befanden sich Aortenstenosen, persistierender Ductus arteriosus botalli und unspezifische Kardiomyopathien. Am häufigsten wurden Klappenstenosen und atriale bzw. ventrikuläre Septumdefekte beschrieben (Farag et al. 1988, Elbedour et al. 1994, Beales et al. 1999, Slavotinek und Biesecker 2000). Es existiert eine Vielzahl an Berichten über eine Leberbeteiligung beim Bardet-Biedl-Syndrom. Hierzu zählen z.B.: die perilobuläre Fibrose, die periportale Fibrose mit kleinen Gallengängen sowie die biliäre Leberzirrhose (Croft und Swift 1990, Nakamura et al. 1990).

1.1.2 Pathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms

Ein entscheidender Schritt zum Verständnis der molekularen Pathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms konnte durch die Entdeckung des *BBS8*-Gens durch Ansley und Mitarbeiter erreicht werden (Ansley et al. 2003). Sie vermuteten, dass den Zilien eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Bardet-Biedl-Syndroms zukommt. Bei mehreren menschlichen Erkrankungen wie z.B. dem Kartagener Syndrom, der autosomal-dominant vererbten Form der polyzystischen Nierenerkrankung und der Nephronophthisis konnten Defekte der Zilien oder des Intraflagellartransports (IFT) nachgewiesen werden (Pazour und Rosenbaum 2002, Ansley et al. 2003, Zhang et al. 2003).

Durch vergleichende Genomstudien konnten bei allen bisher bekannten BBS-Genen orthologe Gene auf ausschließlich Zilien tragenden Organismen gefunden werden (Avidor-Reiss et al. 2004, Li et al. 2004). Die weitergehende Forschung an diesem Thema brachte die Erkenntnis, dass die BBS-Proteine wesentlich an der Organisation der Zellpolarität beteiligt sind (Ansley et al. 2003, Kim et al. 2004 und 2005, Li et al. 2004). Bei Untersuchungen an BBS-Knockout-Mäusen wurden Störungen der Spermienbegeißelung, Retinadegeneration infolge Störungen des Intraflagellartransports und eine partielle oder vollständige Störung des Geruchsinns durch eine Verminderung des Riechepithels gefunden (Kulaga et al. 2004, Mykytyn et al. 2004, Nishimura et al. 2005, Iannaccone et al. 2005). Diese Erkenntnisse stellen erste Schritte zur Erforschung der molekularen Pathogenese des BBS dar.

1.1.3 Die Gene *BBS1-12* und ihre Proteine

Durch Kopplungsanalysen in Familien mit mehreren Betroffenen konnten inzwischen 12 BBS-Gene lokalisiert und charakterisiert werden (*BBS1-BBS12*). Es besteht die Vermutung, dass noch weitere bisher unentdeckte Genloci existieren. Die OMIM-Datenbank (Online Mendelian Inheritance in Man) enthält Informationen über die Gene des Menschen und deren Mutationen. Die Webseite erlaubt einfaches Suchen nach klinischen Symptomen, Erbgang, Molekulargenetik und wissenschaftlichen Publikationen zu erblichen Erkrankungen.

In Tabelle 2 sind die bisher bekannten BBS-Gene, ihre Lokalisation, die OMIM-Nummer und die zugehörigen Literaturstellen aufgelistet. Tabelle 3 zeigt die mögliche Proteindomäne und die vermutete Proteinfunktion zu den 12 bekannten BBS-Genen.

Tab. 2: BBS-Gene und ihre chromosomale Lokalisation

Gen	Position	OMIM	Literatur
<i>BBS1</i>	11q13	209901	Myktyyn et al. 2002
<i>BBS2</i>	16q21	606151	Kwitek-Black et al. 1993, Nishimura et al. 2001
<i>BBS3</i>	3p12-q13	608845	Fan et al. 2004
<i>BBS4</i>	15q22.3-q23	600374	Myktyyn et al. 2001
<i>BBS5</i>	2q31	603650	Li et al. 2004
<i>BBS6</i>	20p12	604896	Stone et al. 2000
<i>BBS7</i>	4q27	607590	Badano et al. 2003
<i>BBS8</i>	14q32.1	608132	Ansley et al. 2003
<i>BBS9</i>	7p14	607968	Nishimura et al. 2005
<i>BBS10</i>	12q21.2	610148	Stoetzel et al. 2006
<i>BBS11</i>	9q31-q34.1	602290	Chiang et al. 2006
<i>BBS12</i>	4q27	610683	Stoetzel et al. 2007

Tab. 3: BBS-Gene, Proteindomäne, Proteinfunktion und die zelluläre Lokalisation

Gen	Proteindomäne	Proteinfunktion	zelluläre Lokalisation	Literatur
BBS1	— (β -Propeller-Form)	Zilienfunktion	Basalkörper/ Zilium	Li et al. 2004 Avidor-Reiss et al. 2004
BBS2	— (β -Propeller-Form)	Zilienfunktion, Flagellenformation	Basalkörper/ Zilium	Li et al. 2004
BBS3/ARL6	GTP- Bindungsdomäne	Vesikeltransport	Basalkörper/ Zilium	Chiang et al. 2004 Fan et al. 2004
BBS4	TPR/PilF	Perizentrioläre Organisation, Retrograder IFT	perizentrioläre Region/ Basalkörper	Kim et al. 2004 Li et al. 2004 Avidor-Reiss et al. 2004
BBS5	DM16/DUF1448	Zilienfunktion, Flagellenformation	Basalkörper/ Zilium	Li et al. 2004
BBS6/MKKS	TCP1-Chaperon	Mikrotubuli-assoziierte Zytokinese	perizentrioläre Region/ Basalkörper	Kim et al. 2005
BBS7	TPR/PilF (β -Propeller-Form)	Partikelmodifizierung für IFT	Basalkörper/ Zilium	Badano et al. 2003
BBS8/TTC8	TPR/PilF	Partikelmodifizierung für IFT	perizentrioläre Region	Ansley et al. 2003, Stoetzel et al. 2006
BBS9/B1	PTHB1	Parathormon-Antwort	Zellen mit Zilien	Nishimura et al. 2005
BBS10	C12orf58 Chaperon	Zilienfunktion	Basalkörper/ Zilium	Stoetzel et al. 2006 Laurier et al. 2006
BBS11/TRIM32	E3 Ubiquitin Ligase	Protein/Protein- Interaktionen	Korreliert mit <i>BBS1</i> und <i>BBS9</i>	Chiang et al. 2006
BBS12	Typ II Chaperon Superfamilie	Zilienfunktion	Korreliert mit <i>BBS6</i> und <i>BBS10</i>	Stoetzel et al. 2007

1.2 Mutationen im *BBS1*-Gen

Dem *BBS1*-Gen kommt bei der Suche nach der molekulargenetischen Ursache der Erkrankung eine entscheidende Rolle zu, da im *BBS1*-Gen 20-25% der bisher entdeckten Mutationen beim BBS in der kaukasischen Bevölkerung zu finden sind (Katsanis et al. 2004). Stoetzel und Mitarbeiter konnten mit der Beschreibung des *BBS10*-Gens ein weiteres Gen identifizieren, welches für ca. 20% aller gefundenen Mutationen beim BBS verantwortlich ist (Stoetzel et al. 2006). Sie konnten bei ungefähr 10% aller BBS-Patienten die Frameshift-Mutation C91fsX95 im *BBS10*-Gen nachweisen.

Das Augenmerk dieser Studie liegt auf dem *BBS1*-Gen. Das *BBS1*-Gen befindet sich auf Chromosom 11q13 (Leppert et al. 1994). Es besteht aus 17 Exons, hat eine Größe von ungefähr 23kb und codiert für ein aus 593 Aminosäuren bestehendes Protein (Mykytyn et al. 2002 und Beales et al. 2003). Die Sequenz von *BBS1* zeigt keine signifikante Homologie zu irgendeinem anderen Protein mit Ausnahme der Region um den N-Terminus, die sehr wahrscheinlich für eine β -Propeller Domäne codiert. Blaque und Mitarbeiter wiesen nach, dass das *BBS1*-Gen beim Fadenwurm *C. elegans* nur auf Zilien tragenden Zellen exprimiert wird und sowohl in der Transitionszone (ähnlich den Basalkörperchen) oder im beidseitig gerichteten Transport entlang des Axonems zu finden ist (Blaque et al. 2004). Die in der Literatur am häufigsten beschriebene Mutation ist die p.M390R-Mutation im *BBS1*-Gen, die bei 18-32% der BBS-Patienten auftritt (Mykytyn et al. 2003, Beales et al. 2003).

In Tabelle 4 sind einige der bereits beschriebenen Mutationen im *BBS1*-Gen aufgeführt. Es handelt sich vorwiegend um Punktmutationen im Sinne von nonsense-Mutationen oder missense-Mutationen. Ebenso wurden auch Deletionsmutationen gefunden, die zur Verschiebung des Leserasters führen.

Tab. 4: Mutationen im *BBS1*-Gen

Exon	Mutation	Literatur
1	c.(-3)_37del	Mykytyn et al. 2003
2	p.H35R	Beales et al. 2003
3	p.K53E	Beales et al. 2003
4	IVS4+1G>A / p.Y113X/V114fsX150 / p.L75fsX98	Mykytyn et al. 2002, 2003 Beales et al. 2003
5	p.R146X / p.D148N c.442G>A	Beales et al. 2003, Fauser et al. 2003 Hoskins et al. 2003
8	p.I1200_T201del / p.E234K	Mykytyn et al. 2003, Beales et al. 2003, Badano et al. 2003
9	IVS9-3C>G / IVS9+1G>A	Beales et al. 2003, Fauser et al. 2003
10	p.Y284fsX288 / p.Q291X / p.G305S / IVS10+1G>A	Beales et al. 2003, Hoskins et al. 2003 Mykytyn et al. 2002, 2003 Fauser et al. 2003
11	p.M347fsX373	Mykytyn et al. 2003
12	p.M390R / p.389delI p.C377_F378delfsX412	Beales et al. 2003; Fauser et al. 2003 Mykytyn et al. 2002, 2003
13	p.R440X / p.R429X / p.Y434S / IVS13-2A>G	Beales et al. 2003 Mykytyn et al. 2003
14	p.R483X	Beales et al. 2003
15	p.L503H / p.L518P / p.L505fsX556 / IVS15+2T>C	Beales et al. 2003, Fauser et al. 2003 Mykytyn et al. 2003 Badano et al. 2003
16	p.L548fsX579 / p.E549X	Beales et al. 2003, Mykytyn et al. 2002 Badano et al. 2003, 2006

1.3 Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms

Das Bardet-Biedl-Syndrom ist eine klinisch und genetisch außerordentlich heterogene Erkrankung. Aufgrund der hohen phänotypischen Variabilität dieser Erkrankung, sowohl inter- als auch intrafamiliär, kamen Zweifel an einem einfachen autosomal-rezessiven, monogenen Erbgang auf.

Katsanis und Mitarbeiter vermuteten in einigen Fällen des BBS, dass es erst durch das Auftreten von drei mutanten Allelen in zwei verschiedenen BBS-Genen (digen) zum Auftreten der Erkrankung kommt (Katsanis et al. 2001). Sie konnten bei BBS-Patienten eine homozygote oder eine compound-heterozygote (zwei verschieden mutante Allele eines Genlocus) Mutation in einem BBS-Gen (Hauptgen) nachweisen und fanden zusätzlich in einem anderen BBS-Gen (Nebengen) eine weitere heterozygote Mutation. Katsanis und Mitarbeiter nannten dieses Beispiel den triallelischen Erbgang und wiesen damit die digene Vererbung beim BBS nach. Die BBS-Gene sind unterschiedlich häufig am digenen Erbgang beteiligt. Der digene Erbgang konnte bisher für alle BBS-Gene gezeigt werden, besonders häufig sind die Gene *BBS4* und *BBS6* involviert, am seltensten *BBS1* (Katsanis et al. 2004).

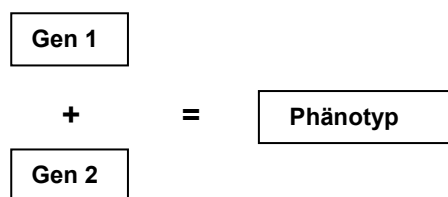


Abb. 1: Schema eines digenen Erbgangs

Es liegen mittlererweile aus der Literatur Hinweise auf das Vorkommen eines oligogenen Erbgangs bei einem Teil der BBS-Familien vor (Katsanis et al. 2004). Dies bedeutet, dass die Vererbung in diesem Fall nicht einfach auf ein einziges Gen zurückzuführen ist, sondern mindestens zwei, wahrscheinlich mehrere Gene beteiligt sind, wobei ein Gen einen viel grösseren Einfluss als die anderen beteiligten Gene haben kann.

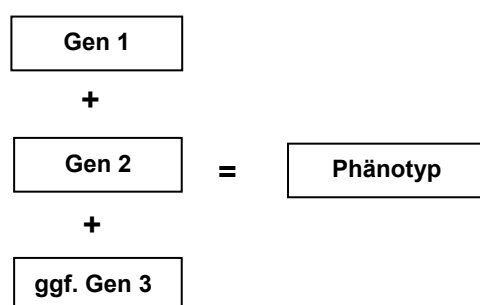


Abb. 2: Schema eines oligogenen Erbgangs

Es ist bisher noch ungeklärt, in welcher Art und Weise die bisher bekannten 12 BBS-Gene miteinander interagieren und ob weitere, bisher noch nicht identifizierte Interaktionspartner existieren. Anhand der Daten aus der Literatur muss davon ausgegangen werden, dass das Bardet-Biedl-Syndrom zusätzlich zum autosomal-rezessiven Erbgang, der besonders häufig beim *BBS1*-Gen dargestellt werden konnte, dem Schema eines digenen oder oligogenen Erbganges folgt.

1.4 Ziele und Fragestellung der Studie

Ein Ziel dieser Studie war es die Ausprägung des BBS-Phänotyps, bei den an der Marburger-Studie teilnehmenden Patienten, zu erfassen und mit den internationalen Daten zu vergleichen. Dafür sollten möglichst viele Patienten, die an der molekulargenetischen Untersuchung teilnahmen, auch in Bezug auf die klinischen Symptome der Erkrankung analysiert werden. Für die Erfassung der Ausprägung des Phänotyps sollte ein Fragebogen benutzt werden, der auf die klinischen Symptome des BBS einging und in leicht verständlicher Sprache formuliert war. Die Patienten bzw. ihre Eltern sollten in der Lage sein, den Fragebogen ohne weitere Fachkenntnisse auszufüllen. Um alle BBS-Patienten dieser Studie zu erreichen, sollte der Fragebogen den Familien zugesandt werden.

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit standen die DNA-Proben von 51 BBS-Patienten zur Analyse zur Verfügung. Ziel war die Beteiligung des *BBS1*-Gens an der Pathogenese der Erkrankung bei deutschen BBS-Patienten herauszufinden. Dafür sollte mit Hilfe einer schnellen und leicht durchführbaren Methode ein Screening auf die im *BBS1*-Gen am häufigsten vorkommende Punktmutation c.1169T→G (p.M390R) in Exon 12 durchgeführt werden. Für den gezielten Nachweis dieser Mutation bei den 51 Patienten sollte ein *AvaII*-Restriktionsverdau verwendet werden. Als Screeningmethode für die Mutationsanalyse des gesamten *BBS1*-Gens sollte die single-strand conformational analysis (SSCA) benutzt werden. Es sollten die Exons 4, 5, 8, 10, 12, 13, 15 und 16 des *BBS1*-Gens mit Hilfe dieser Methode auf Mutationen gescreent werden. Diese acht der insgesamt 17 Exons des *BBS1*-Gens wurden ausgewählt, da in der Literatur in jedem dieser Exons bereits Mutationen beschrieben worden waren. Die bei der SSCA auffälligen DNA-Proben sollten in einem weiteren Arbeitsschritt einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Grundchemikalien für Puffer und Lösungen wurden in p.A.-Qualität bezogen.

Accugel (40%) Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid 19:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Alconox	New York, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Eastman Kodak, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid 99,7% (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll (Typ 400)	Sigma Chemical Company, UK
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt
Hydrolink Long Ranger	FMC Bioproducts, USA
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MetaPhor-Agarose	FMC BioProducts, USA
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
NF 10 × TBE-Puffer Rotiphorese	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel A	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure, mind. 37%	Riedel-de-Haën, Seelze
SDS	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen ausschließlich von folgenden Firmen: Amersham (USA), Gibco BRL (USA), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (UK).

2.1.2 Enzyme, Fertigpuffer und Nukleinsäuren

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA-Marker	Gibco BRL, USA
50 bp DNA-Marker	Gibco BRL, USA
25 bp DNA-Marker	Gibco BRL, USA

Desoxynukleotide

DNA-Polymerisierungsmix (je 20 mM/dNTP)	Pharmacia Biotech, Schweden
Advantage UltraPure dNTP Combination Kit	Clontech, Heidelberg

Oligonukleotidprimer

Roth, Karlsruhe

PCR-Reagenzien:

MgCl ₂ -Puffer (25 mM)	Amersham, UK
10×PCR-Puffer	Amersham, UK
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	Amersham, UK

Qiagen PCR Purification Kit

Qiagen, Hilden

Qiagen Gel Extraktion Kit

Qiagen, Hilden

Advanced GC Genomic PCR Kit

Clontech, Heidelberg

Proteinase K

Boehringer, Mannheim

Pronase (100 μg/μl)

Boehringer, Mannheim

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer werden, soweit nicht anders angegeben, mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

Ethidiumbromidstammlösung	10 mg/ml
Ethidiumbromidfärbebad	1 µg/ml
Gelladepuffer:	
6 × Agarosegelladepuffer I	0,25% Xylencyanol 15% Ficoll
6 × Agarosegelladepuffer II	0,25% Bromphenolblau 15% Ficoll
6 × Agarosegelladepuffer III	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 15% Ficoll
6 × PAA-Gelladepuffer	98% Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
RCLB	10 mM Tris-HCl 10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ , pH 7,6
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA, pH 8,0
5 × TBE-Puffer	10 mM EDTA 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0
1 × TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 7,6

2.2 Geräte und Zubehör

PCR

Thermocycler:

GeneAmp PCR System 9600

PCR System 2400

Perkin Elmer

Perkin Elmer Cetus, USA

Gelelektrophorese

Gelelektrophoresekammern:

horizontal 11 x 14

vertikal 15 x 17

Gelelektrophoreseschlitten

Agarosegelkämme (1 mm und 2 mm)

Gibco BRL, USA

Gibco BRL, USA

Medizintechnik, Marburg

Gibco BRL, USA

SSCA

PAA-Gelkämme (0,75 mm)

Einmachfolie (Zellglas)

Elektrophorese Cassette

Hoefer Elektrophorese Kammern SE600

Puffertank (Modell IPU 096)

Gibco BRL, USA

Folia Paper, Wendelstein

INGENY, Niederlande

Amersham Pharmacia Biotech, USA

INGENY, Leiden, Niederlande

Sequenzierung

ABI 373 Sequencer

ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Haifischzahnkamm (0,3 mm)

Kühlzentrifuge Sorvall RT 6000 B

Mikroliterspritze

Applied Biosystems, Darmstadt

Applied Biosystems, USA

Perkin Elmer Cetus, USA

Du Pont, USA

Hamilton, Schweiz

Allgemeine Geräte

Autoklav

Magnetrührer Ikamag RO

Mikrowelle 900 Watt

Milli-Q-Wasseraufarbeitungssystem

M 52 minishaker

Photometer Gene Quant II

Gössner, Hamburg

Ika-Werk, Staufen

Bosch, Stuttgart

Millipore Membrantechnik, Bodenheim

IKA Wilmington, USA

Pharmacia Biotech, Schweden

Pipetten:

Eppendorf-Pipetten

Multipette

Mehrkanalpipette

Pipettenspitzen

Pipettierhilfe Automatik Sarpette

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Sarstedt, Nürnberg

Micro-Bio-Tec Brand

Sarstedt, Nürnberg

Reaktionsgefäße:

Falcon Tubes (50 ml und 14 ml)

MicroAmp Reaction Tubes

Micro Test Tubes (0,5 ml und 1,5 ml)

Falcon, USA

Perkin Elmer Cetus, USA

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Rotator GFL 3025

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwald

Spannungsgeber:

PS 9009TC

Typ PP2 79

Schüttler Typ 270

Gibco BRL, USA

Life Technologies, Dänemark

Tecnomara AG, Zürich

Thermostat-Metallblock Techne DB 3

Kobe, Marburg

Tischzentrifugen:

Biofuge 13

Eppendorf Zentrifuge 5415 C

UV-Transilluminator UVT2035 (302 nm)

Vortex Reax 2000

Heraeus, Hanau

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Herolab, Wiesloch

Heidolph, Hamburg

Waagen:

Präzisionswaage 2254

Feinwaage AE 240

Wasserbad Typ 1083

Sartorius, Göttingen

Mettler, Schweiz

GFL, Burgwedel

Hier nicht aufgeführte Geräte der Laborgrundausrüstung wurden von der Medizintechnik (Philipps-Universität Marburg) und der Fa. Kobe (Marburg) bezogen.

2.3 Software

Textverarbeitung

Word 2000, Microsoft

Datenverwaltung

Excel 2000, Microsoft

Access 2000, Microsoft

Literaturverwaltung

Endnote 6.0, Niles Software

Grafik

PowerPoint, Microsoft

Photoshop 6.0, Adobe

Sequenzanalyse

Sequencher 4.1, Gene Codes

Sequence Navigator 1.0, Applied Biosystems

Oligo 5.0, Molecular Biology Insights

2.4 Experimentelle Methoden

2.4.1 DNA-Isolierung aus Blutleukozyten

Genomische DNA kann mit Hilfe der Aussalzmethode nach Miller aus den Zellkernen der Blutleukozyten präpariert werden (Miller et al. 1988). 10 ml EDTA-Blut (nach Lagerung bei -20°C) werden mit 30 ml kaltem RCLB-Puffer (Red Cell Lysis Buffer) versetzt, geschüttelt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Während dieser Zeit lysieren die Erythrozyten im hypotonischen Puffer, die Leukozyten bleiben intakt und können durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 3000 rpm und 4°C) sedimentiert werden.

Der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird mit 25 ml RCLB suspendiert und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet, das nach Verwerfen des Überstandes zurückbleibt, wird mit 5 ml SE-Puffer, 2,5 μl Proteinase K sowie 500 μl 10%iger SDS-Lösung versetzt. Die Proben werden nun im Schüttelwasserbad bei 55°C für drei Stunden oder bei 37°C über Nacht inkubiert. Die freigesetzten Proteinbestandteile der Leukozyten werden durch Zugabe von 2 ml 5 M NaCl gefällt und abzentrifugiert. Im Überstand befindet sich jetzt die gelöste DNA, die durch Zugabe von 30 ml 96%igem eiskaltem Ethanol gefällt wird. Die deutliche sichtbare DNA wird mit einer Pasteurpipette entnommen, in 70%igem Alkohol gewaschen und in 200-600 μl TE-Puffer auf einem Rotator gelöst.

2.4.1.1 DNA-Aufreinigung

Werden nach Lösen der DNA-Probe in TE Proteinrückstände gesehen, oder zeigt die Photometrie Verunreinigungen an, muss die DNA gereinigt werden. Die zu reinigende DNA wird mit 1/10 Volumen 20 x SSC und 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase A versetzt und über eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird ein 1/100 Volumen SDS und 10 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K zu der DNA-Probe gegeben. Über Nacht werden die Proteine in der Probe bei 37°C verdaut. Der Ansatz wird mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gemischt und 15 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt. Ihr wird ein gleiches Volumen einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) zugefügt. Die Probe wird 15 Minuten zentrifugiert. Die DNA befindet sich jetzt in der oberen Phase und wird mittels eines halben Volumens Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt, herunterzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in TE-Puffer gelöst.

2.4.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration kann bestimmt werden, indem man 1 μl des DNA-Stocks auf ein 1%iges Agarose-Gel aufträgt, und das Gel mit Ethidiumbromid färbt. Durch die Stärke der Bande, die sich bei der elektrophoretischen Auftrennung ergibt, kann auf die DNA-Konzentration geschlossen werden. Um die genaue Konzentration zu erhalten, bedient man sich der Spektralphotometrie.

Die doppelsträngige DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge und bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm entspricht eine Absorption von 1,0 einer DNA-Doppelstrang-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Es wird eine 1:200-Verdünnung von der jeweiligen DNA mit Wasser hergestellt und als Differenzabsorption gegen einen Leerwert (H_2O) gemessen. Um eine Verunreinigung durch Proteine zu ermitteln, wird ebenfalls die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der Proteine, gemessen. Bei proteinfreien DNA-Isolaten liegt der Wert des Quotienten ($\text{Absorption}_{260}:\text{Absorption}_{280}$) bei ca. 1,8 (Sambrook et al. 1989). Werte $> 2,0$ weisen auf RNA-Rückstände, Werte $< 1,7$ auf Proteinverunreinigungen hin.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion nach Saiki ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren und die Basismethode für die hier vorliegende Arbeit (Saiki et al. 1985). Das Prinzip der PCR besteht aus drei Schritten. Erstens der Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge, zweitens dem Annealing, der Anlagerung der Primer, und drittens der Elongation mit dem Aktivitätsoptimum der Taq-DNA-Polymerase. PCR-Reaktionsansätze müssen grundsätzlich auf Eis pipettiert werden, um unspezifische Reaktionen der Taq-Polymerase zu verhindern.

Dabei wird die Matrizen-DNA vorgelegt, aus den übrigen Lösungen (Puffer, Nukleotide, Taq-Polymerase, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, H₂O) ein Reaktionsgemisch angesetzt und dieses auf die Proben verteilt.

Bei jeder PCR-Reaktion ist ein Leerwert mitzuführen (Reaktionsansatz ohne DNA-Probe), um Verunreinigungen des PCR-Reaktionsgemisches ausschließen zu können. Die PCR-Standardbedingungen werden für das jeweilige Produkt modifiziert. Die PCR wurde in Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln durchgeführt. Das Ergebnis jeder PCR wird durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die Konzentration des Agarosegels wird je nach Fragmentgröße und gewünschter Trennschärfe variiert. Alle aufzutragenden Produkte (10 µl) werden vor der Elektrophorese mit einem Gelladepuffer (2-3 µl) versetzt. Agarose ist ein Polysaccharid aus Rotalgen und liegt in Pulverform vor. Es wird in 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht und geliert beim Abkühlen. Hat das noch flüssige Gel eine Temperatur von ca. 50°C erreicht, wird Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gemisch in einen mit Kämme bestückten Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels werden die Kämme gezogen und der Gelschlitten in die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern gestellt. Bei jeder Elektrophorese ist ein DNA-Längenstandard mitzuführen. Die DNA-Fragmente werden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Tab. 5: Zusammensetzung und Anfertigung von Agarosegelen

Agarosegele zur Auftrennung von PCR-Produkten	
Agarosekonzentration	2%
Gel-/Laufpuffer	0,5 x TBE
Gelgröße (cm x cm)	14 x 11
Gelvolumen	100 ml
Probenvolumen	10 µl
Ladepuffer	3 µl
Längenstandard	100 bp Marker
Spannung	200 V
Laufzeit	15-30 Minuten

2.4.4 Genstruktur von *BBS1*

Das *BBS1*-Gen liegt auf Chromosom 11q13. Das Gen besteht aus 17 Exons, die eine Größe von 39 bp bis 1663 bp haben. Die Größe der 16 Introns variiert zwischen 0,1 kb und 3,7 kb (Mykytyn et al. 2002). Die in dieser Studie untersuchten Exons sind fett markiert (Tabelle 6).

Tab. 6: Exongrößen von *BBS1*

Exon	Größe in bp
Exon 01	59
Exon 02	77
Exon 03	35
Exon 04	273
Exon 05	47
Exon 06	39
Exon 07	73
Exon 08	132
Exon 09	107
Exon 10	121
Exon 11	159
Exon 12	70
Exon 13	159
Exon 14	134
Exon 15	135
Exon 16	87
Exon 17	1663

Die in dieser Studie untersuchten Exons sind fett markiert.

Die häufigste Mutation ist eine Punktmutation in Exon 12. Es kommt an der Stelle 1169 zu einem Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) (1169T → G). In Folge dieser Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein an Stelle 390 (Abb. 3).

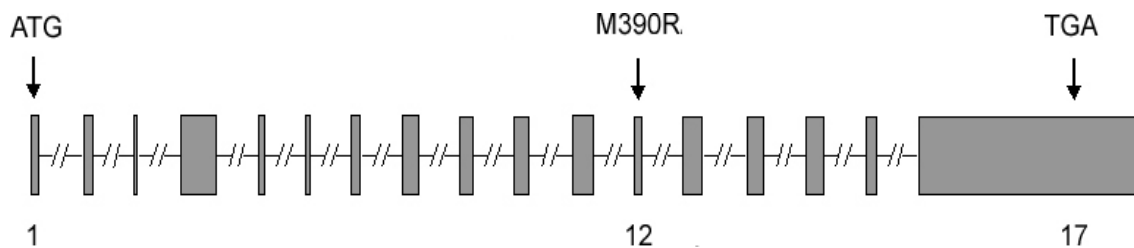


Abb. 3: Genstruktur von *BBS1* (Mykytyn et al. 2002)

Die Rechtecke stellen die 17 Exons dar. Das Startcodon ATG liegt in Exon 1, das Stoppcodon TGA in Exon 17. Die häufigste Mutation, der Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) liegt an der Stelle 1169 (c.1169T → G) in Exon 12. Diese Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein an der Stelle 390.

2.4.5 Restriktionsspaltung mit *Ava*II zum Mutationsscreening

Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Da die Sequenzspezifität der Restriktionsenzyme erheblich von Art und Konzentration der in der Reaktionslösung vorhandenen Ionen abhängt, wurde der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer eingesetzt. Die Spaltung genomischer DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, mit 1-5 Units des Enzyms *Ava*II pro 1 µg genomischer DNA. Die Inkubation erfolgte 1 – 2 h im Thermoblock bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur.

2.4.6 Genotypisierung der Punktmutation c.1169T → G in Exon 12 (p.M390R)

Der Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) an der Stelle 1169 in Exon 12 führt zum Austausch von Methionin (M) zu Arginin (R) in dem von *BBS1* codierten Protein. Der homozygote Wildtyp wird mit 390MM, heterozygote Mutationen mit 390MR und homozygote Mutationen werden mit 390RR angegeben. Zur Genotypisierung wurde das Exon 12 gemeinsam mit seinen flankierenden Bereichen mit Hilfe der PCR amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit der Länge 300 bp durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym *Ava*II fragmentiert. Die für die Restriktionsspaltung mit *Ava*II in Exon 12 von *BBS1* verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tab.7: Oligonukleotide für die Restriktionsspaltung mit *Ava*II in Exon 12 von *BBS1*

Exon	Primer	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Produkt	Annealing Temperatur
12	forward	Exon 12 89F	tatttcagaggcagcgattc	300 bp	60°C
12	reverse	Exon 12 388R	atgcttcattccacctcct		

Die Punktmutation 1169G führt im PCR-Produkt mit den Primern Exon 12 89F und Exon 12 388R zu einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Ava*II (Abb. 4).

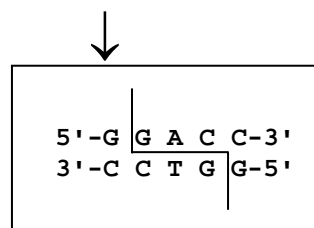


Abb. 4: Darstellung der Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *Ava*II

Bei dem Basenaustausch von Thymin (T) zu Guanin (G) entsteht eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Ava*II. Der schwarze Pfeil zeigt die Stelle des Basenaustausches (Position 1169) an. Abkürzungen: G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin.

Bei gesunden Probanden entsteht ein Produkt mit der Länge von 300 bp. Heterozygote Träger zeigen drei Fragmente mit den Längen 300 bp, 196 bp und 104 bp. Homozygot erkrankte Patienten weisen zwei Fragmente mit den Längen 196 bp und 104 bp auf. Durch gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauprodukte (104 bp und 196 bp) ist eine Genotypisierung möglich (Abb. 5).

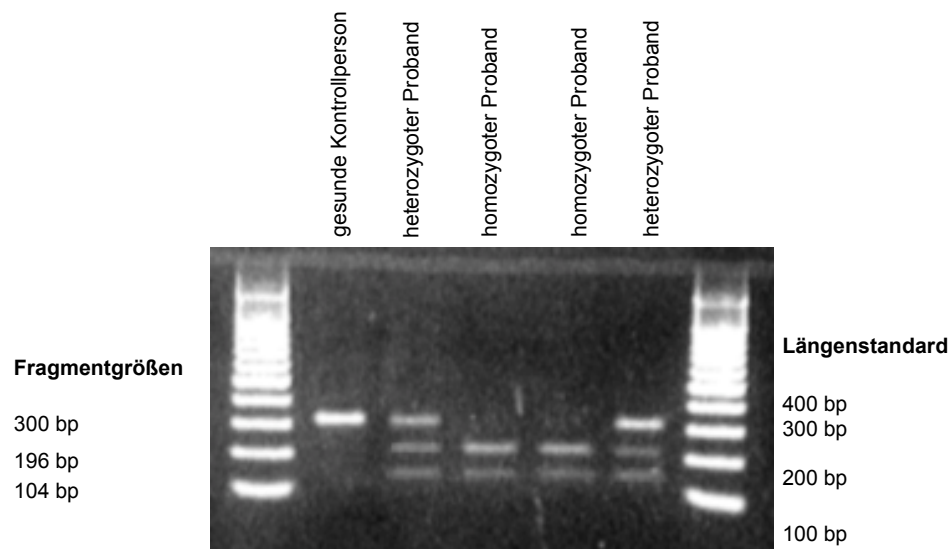


Abb. 5: Ergebnis der Restriktionsspaltung der DNA-Proben mit *Ava*I zur Detektion der Mutation c.1169T → G in Exon 12. Die Kontrollperson zeigt nur das 300 bp lange Fragment. Heterozygote Träger der Mutation zeigen drei Fragmente mit den Längen 300 bp, 196 bp und 104 bp. Homozygote Träger der Mutation zeigen zwei Fragmente mit den Längen 196 bp und 104 bp.

2.4.7 Oligonukleotide für *BBS1*

Alle Oligonukleotide wurden von Roth (BRD) in *desalted* Qualität bezogen. Die Referenzsequenz Acc.Number: AF503941 stammt von der Gendatenbank der Universität Kalifornien (<http://genome.ucsc.edu>). Alle Primer sind selbst gelegt. In Tabelle 8 sind die verwendeten Primer zum Mutationsscreening in Exon 4, 5, 8, 10, 12, 13, 15 und 16 des *BBS1*-Gens dargestellt. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die intronsische Lage der Primer, Großbuchstaben ihre Lage im Exon. Das Exon 4 musste aufgrund seiner Größe unterteilt werden.

Tab. 8: Oligonukleotide für das Mutationsscreening in *BBS1* (SSCA und Sequenzierung)

Exon	Primer	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Vwdg.	Produkt	Ann. Temp.
4a	forward	BBS1 Ex4a 177F	tgagcctagaatgagccatc	PCR	214 bp	58°C
4a	reverse	BBS1 Ex4a 390R	acatagacacaagggcctga	PCR		
4b	forward	BBS1 Ex4b 270F	caatggtgatgaccgaaag	PCR	239 bp	61°C
4b	reverse	BBS1 Ex4b 508R	ttccaactcccattgtatt	PCR		
5	forward	BBS1 Ex5 F	tagacattgggttctctgcc	PCR	232 bp	58°C
5	reverse	BBS1 Ex5 R	aaggctcctctgccgtct	PCR		
8	forward	BBS1 Ex8 F	gtggtgtgtggaggtccct	PCR	275 bp	59°C
8	reverse	BBS6 Ex8 R	ggagcatggggagagaatg	PCR		
10	forward	BBS1 Ex10 93F	ggagggtcagccatagaagt	PCR	232 bp	60°C
10	reverse	BBS1 Ex10 324R	tagggacataggcgtggag	PCR		
12	forward	BBS1 Ex12 89F	tatttcagaggcagcgattc	PCR	300 bp	60°C
12	reverse	BBS1 Ex12 388R	atgcttcattccacctct	PCR		
12	forward	BBS1 Ex12 19F	gtgagggccagtgatatttg	PCR	370 bp	60°C
12	reverse	BBS1 Ex12 388R	atgcttcattccacctct	PCR		
13	forward	BBS1 Ex13 F	gtttgggaagaagaatgg	PCR	302 bp	58°C
13	reverse	BBS1 Ex13 R	attccccagcttctgtgt	PCR		
15	forward	BBS1 Ex15 F	ccaggtcctaagggctttct	PCR	215 bp	58°C
15	reverse	BBS1 Ex15 R	ggccttcccactccatc	PCR		
16	forward	BBS1 Ex16 F	ccaaacactggcagcagg	PCR	194 bp	57°C
16	reverse	BBS1 Ex16 R	acccttactgtcctcccag	PCR		

2.4.8 Single-strand conformational analysis (SSCA)

Die Einzelstrangkonnformationsanalyse [single-strand conformational analysis (SSCA)] gehört zu den Methoden, die mit DNA-Proben arbeiten. Es wird denaturierte, einzelsträngige DNA auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die beiden Einzelstränge nehmen nun durch Basenpaarung mit sich selbst eine dreidimensionale Struktur ein, die auf der Primärstruktur des jeweiligen Einzelstranges beruht. DNA-Einzelstränge mit gleicher Basensequenz legen in einer bestimmten Zeit die gleiche Wegstrecke im Gel zurück und werden nach der Färbung somit in gleicher Höhe sichtbar. Änderungen der Primärstruktur des Einzelstranges in Form von Insertion, Deletion oder den Austausch einer oder mehrerer Basen, verändern auch die dreidimensionale Struktur des Einzelstranges und dessen Laufeigenschaften im Polyacrylamidgel.

Als Resultat findet man nach dem Anfärben bei einer mutierten Probe ein Fragmentmuster, das sich von dem des Wildtypen unterscheidet. Je nachdem, ob es sich beim Träger um eine homozygot oder eine heterozygot vorliegende Mutation handelt sind, entweder beide Banden (beide Allele) oder nur eine Bande (eines der beiden Allele) different zu den Wildtyp-Banden.

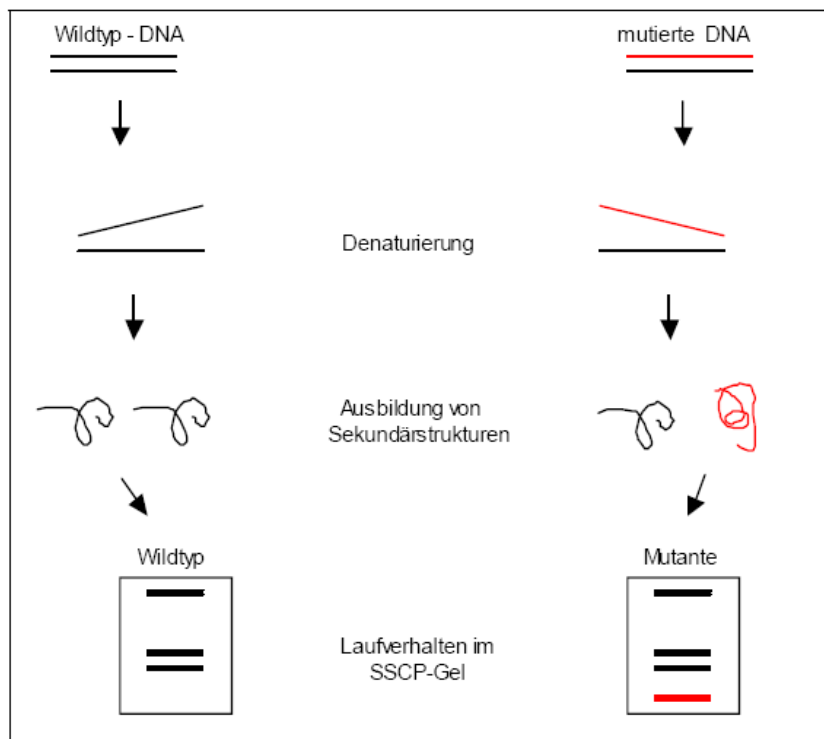


Abb. 6: Prinzip der SSCA (nach Grompe et al. 1993)

Die durch unterschiedliche Bandenmuster auffallenden Proben können dann mittels DNA-Sequenzierung analysiert werden, um die jeweilige Art der Mutation und die damit verbundene molekulargenetische und mögliche klinische Relevanz festzustellen. Die Sensitivität der SSCA ist entscheidend abhängig von der Größe der analysierten DNA-Fragmente. Sie ist am höchsten für DNA-Fragmente der Größe von 130-300 bp. Ebenfalls entscheidend für die Sensitivität ist die Position des Basenaustausches, der GC-Gehalt der Sequenz, die Art der Mutation und das Verwenden von Gelen mit unterschiedlichen Laufbedingungen bei der Elektrophorese (Sheffield et al. 1993).

In dieser Arbeit wurden nur 12%ige Gele benutzt. Als Elektrophorese-Systeme dienten Hoefer Elektrophorese-Kammern von der Firma Amersham.

Um die PAA-Gele herzustellen, werden die Glasplatten mit destilliertem Wasser und 96%igem Ethanol geputzt, die passenden Spacer seitlich zwischen die beiden Glasplatten gelegt und die Hoefer-Apparatur zusammengesetzt.

Die Gelbestandteile werden laut Tabelle 9 zusammengegeben und gut durchgemischt. Dann wird die Gellösung mit einer 20ml-Spritze zwischen die Glasplatten gespritzt und der entsprechende Gelkamm wird eingesetzt. Nach ca. zwei Stunden ist das Gel polymerisiert. Der Kamm wird gezogen und die Taschen mit den Proben beladen. Vor dem Auftragen werden die Proben 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Ein Längenstandard ist immer mitzuführen. Jetzt werden die Platten in die mit 0,5 x TBE gefüllten Elektrophorese-Kammern eingesetzt und die Elektrophorese bei 500V und 20°C für 2 Stunden oder 600V und 10°C für 1,5 Stunden durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden durch die Silberfärbung sichtbar gemacht.

Tab. 9: Zusammensetzung SSCA-Gele

12%iges nicht-denaturierendes PAA-Gel für SSCA

Gelbestandteile:

H ₂ O	21,9 ml
10 x TBE	2,5 ml
Rotiphorese A	19,6 ml
Rotiphorese B	6,0 ml
APS (10%)	350 µl
TEMED	17,5 µl
PCR-Produkt	5 µl
Denaturierender Ladepuffer	5 µl
Laufzeit	1,5 oder 2 h
Spannung	500 oder 600 V
Temperatur	20°C oder 10°C

2.4.8.1 Färbung mit Silbernitrat

Die Methode der Silberfärbung wird benutzt, um die in der SSCA aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen (nach Budowle et al. 1991). Die einzelnen Färbeschritte sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Bei der Silberfärbung lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an. Durch den in der Entwicklerlösung enthaltenen Formaldehyd werden die Silberionen reduziert und abschließend mit Natriumcarbonat gefällt. Das Gel wird so lange in der Entwicklerlösung inkubiert, bis die Fragmente die gewünschte Farbtintensität zeigen. Durch das Einlegen des Gels in den Fixierer (Essigsäure) wird die Reaktion gestoppt. Das Gel wird zum Trocknen zwischen zwei Folien in einem Spannrahmen fixiert. Mit Hilfe von Glycerol wird das Brechen des Gels verhindert.

Tab. 10: SSCA-Silberfärbung (modifiziert nach Budowle et al. 1991)

Schritt	Lösung	Zusammensetzung	Dauer
1.	10% Ethanol	50 ml Ethanol abs., 2,5 ml Eisessig H ₂ O ad 500 ml	5 min
2.	1% Salpetersäure	7,7 ml Salpetersäure 65%, H ₂ O ad 500 ml	8 min
3.	H ₂ O		1 x 2 min spülen
4.	Silbernitrat-Lsg.	510 mg AgNO ₃ , H ₂ O ad 250 ml	20 min
5.	H ₂ O		3 x 2 min spülen
6.	Entwickler	10 g Na ₂ CO ₃ , 500 µl Formaldehyd, H ₂ O ad 500 ml	1-2 x spülen, dann ca. 2 min einwirken lassen
7.	10% Essigsäure	50 ml Eisessig, H ₂ O ad 500 ml	1 x spülen
8.	H ₂ O		
9.	Konservierer	100 ml Ethanol abs., 29 ml Glycerol 87%, H ₂ O ad 500 ml	mind. 30 min

2.4.9 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Basenabfolge in einem DNA-Abschnitt genau zu bestimmen, bedient man sich heutzutage vor allem der enzymatischen Methode z. B. nach Sanger (Sanger et al. 1977).

Im Reaktionsansatz befinden sich das zu sequenzierende PCR-Produkt, der passende Vorwärts- oder Rückwärtsprimer (es wird jeweils nur ein Strang sequenziert), die Polymerase und 2'-Desoxynukleotide. Die Elongation der Fragmente erfolgt durch die Taq-Polymerase, der DNA-Synthese-Start durch den jeweiligen zugegebenen Primer. In einem bestimmten Verhältnis werden 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) hinzugefügt. Da die ddNTPs in Position 3 ein H-Atom anstelle der üblichen OH-Gruppe besitzen, bewirken sie an dieser Stelle einen Kettenabbruch. Für das System, mit dem in dieser Untersuchung gearbeitet wurde, werden die ddNTPs fluoreszenzmarkiert. Man spricht deshalb auch von dem Fluoreszenz-Terminator-System. Während der Polymerisierungsreaktion werden die 2'-3'-Didesoxynukleotide in den replizierten DNA-Strang eingebaut. Dadurch entstehen Oligonukleotidstränge unterschiedlicher Länge, die durch den bestimmten Fluoreszenzfarbstoff der letzteingebauten Base gekennzeichnet sind. Mit Hilfe eines denaturierenden Harnstoffgels werden die Stränge nach ihrer Größe getrennt. Die farbcodierten End-Nukleotide können der Reihe nach abgelesen werden und ergeben so die Sequenz des Vorlagen-Stranges. Zur Sequenzreaktion wird der Big Dye® Terminator-Mix von Applied Biosystems eingesetzt, der Taq-Polymerasen, Puffer, unmarkierte dNTPs und markierte ddNTPs enthält.

2.4.9.1 Vorbereitung der Proben

Es besteht die Möglichkeit PCR-Produkte direkt zu sequenzieren. Die Aufreinigung der Proben erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kit® von Qiagen gemäß den Anleitungen des Herstellers. Primer- und Enzymreste sowie Salze werden dabei aus dem PCR-Ansatz entfernt, indem das PCR-Produkt mit einem ethanolhaltigen Puffer versetzt auf eine Säule gegeben, durch mehrere Zentrifugationsschritte gereinigt und schließlich mit H₂O oder Elutionspuffer gelöst wird.

Als zweite Möglichkeit können allelspezifische Sequenzierungen durchgeführt werden. Hierbei werden aberrante Fragmente und Wildtypfragmente aus dem gefärbten, getrockneten SSCA-Gel ausgestochen. Sie werden über Nacht bei 4°C in 50-100 µl HPLC-Wasser gelöst. Da die erhaltenen DNA-Mengen gering sind, wird eine Reamplifikations-PCR durchgeführt. Nachdem die regelrechte Amplifikation auf einem 2%igen Agarose-Gel kontrolliert wurde, muss auch dieses Reamplifikationsprodukt wie oben beschrieben aufgereinigt werden.

2.4.9.2 Sequenzreaktion

Für diesen Schritt wird der Big Dye® Terminator Mix von Applied Biosystems verwendet. Um Fluoreszenzverluste zu vermeiden, werden alle Arbeitsschritte im Dunkeln ausgeführt. Der Sequenzansatz wird auf Eis pipettiert. Er besteht aus max. 5 µl DNA (50-100 ng), 1 µl Vorwärts/Rückwärtsprimer (50 bzw. 100 pmol/µl), 4 µl Big Dye® Terminator Mix und H₂O ad 10 µl.

Die standardmäßige Sequenzreaktion beginnt mit einer initialen Denaturierung (3 min/96°C). Es folgen 25 Zyklen mit Denaturierung (10 sec/96°C), Hybridisierung (5 sec/primerspezifische Temperatur) und Synthese (4 min/60°C). Abschließend wird auf 4°C gekühlt.

Zur Fällung werden 10 µl des Sequenzansatzes mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 80 µl Ethanol (100%ig) versetzt und 20 Minuten bei –20°C inkubiert. Der Ansatz wird fünfzehn Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgezogen. Der Niederschlag wird in 500 µl Ethanol (70%ig) gewaschen und für 10 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abgezogen und verworfen. Das verbleibende Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und direkt auf das Sequenzgel geladen oder bei –20°C gelagert.

2.4.9.3 Herstellung eines Sequenzgels

Für die elektrophoretische Auftrennung der markierten Proben wird ein 6%iges Polyacrylamidgel verwendet. Dieses ist optimal für Fragmente zwischen 25 und 400 Nukleotiden.

Die Gellösung setzt sich aus 18 g Harnstoff, 26 ml H₂O, 5 ml 10 x TBE, 5 ml Hydrolink Long Ranger, 250 µl APS und 35 µl TEMED zusammen und wird vor Zugabe von APS und TEMED im Wasserbad bei 50°C gelöst und filtriert. Anschließend wird sie zügig und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der TOP-Spacer eingesetzt. Die Polymerisierung dauert eine Stunde.

2.4.9.4 Sequenzanalyse

Das Sequenzgel wird nach der Polymerisierung in den ABI 373 Sequencer eingespannt. Die obere Pufferkammer wird mit 1 x TBE gefüllt und der Zahnkamm eingesetzt, sodass er ca. 1 mm in das Gel hineinragt. Den Proben wird 1,5 - 3,5 µl Ladepuffer je nach Kammart (5:1 deionisiertes Formamid zu 50 mM EDTA) zugesetzt.

Es wird zuerst nur jede zweite Geltasche geladen und nach zweiminütigem Vorlauf die übrigen. Die Elektrophorese erfolgt je nach Produktgröße (ca. 100 bp/h) bei 37 Watt.

Zur Sequenzanalyse bedient man sich der DNA Sequencing Software, Version 2.1.1 von Perkin Elmer, USA. Zur Auswertung und Bearbeitung der erhaltenen Sequenzen wird das Programm Sequence Navigator, Version 1.0 (Applied Biosystems) verwendet.

3. Patienten

Fragebogen über die klinischen Symptome des BBS

Zur Erfassung der Ausprägung des BBS-Phänotyps sollte ein Fragebogen entworfen werden, der Fragen über die Haupt- und Nebensymptome des Bardet-Biedl-Syndroms sowie zusätzliche Fragen über Schulabschluss, Ausbildung und Beruf enthielt. Abgesehen von einigen offenen Fragen handelt es sich vorwiegend um geschlossene, dichotome Fragen mit den Antwortmöglichkeiten ja oder nein.

Dieser Fragebogen wurde den an dieser Studie teilnehmenden BBS-Familien zugesandt (n=51). Von den insgesamt 51 BBS-Patienten wurden 30 vollständig ausgefüllte Fragebögen zurückgesandt und konnten zur Auswertung mit herangezogen werden. Unter diesen 30 Patienten befanden sich 10 weibliche und 20 männliche BBS-Patienten. Zwei Patienten (2/30) stammten aus türkischen Familien, ein Patient (1/30) kam aus einer libanesischen Familie. Die anderen (27/30) waren gebürtige Deutsche. Einer der beiden türkischen Patienten und der aus dem Libanon stammende Patient kamen aus blutsverwandten Familien. Das Durchschnittsalter der 30 BBS-Patienten lag bei 21 Jahren.

In 19 von 30 Fällen wurde der Fragebogen von den Eltern oder mit Hilfe der Eltern ausgefüllt. Von diesen 19 Patienten waren 11 Patienten aufgrund einer mentalen Retardierung nicht in der Lage den Fragebogen zu beantworten und acht Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studie im Kindes- oder Jugendalter. Sechs BBS-Patienten konnten den Fragebogen selbstständig ausfüllen und zurückschicken. Bei insgesamt drei Patienten wurde der Inhalt des Fragebogens während der humangenetischen Beratung im Zentrum für Humangenetik in Marburg abgefragt und bei zwei Patienten wurde der Inhalt des Fragebogens anhand von zugesandten Arztunterlagen des jeweiligen Patienten erhoben.

3.1 Patienten und Kontrollpersonen

Insgesamt 51 Patienten (29 männlich, 22 weiblich) im Alter von 2 bis 59 Jahren sowie ihre 106 Familienmitglieder, konnten für eine Teilnahme an dieser Studie gewonnen werden. Zu den Familienmitgliedern gehörten 32 Mütter, 33 Väter, neun Geschwister mit BBS und 32 Geschwister ohne BBS. Kein Elternteil war betroffen. Sieben Elternpaare hatten mehr als ein betroffenes Kind, davon waren vier Familien türkischer Abstammung. Insgesamt nahmen an dieser Studie 39 Familien aus Deutschland, zehn türkische Familien, eine libanesische Familie und eine kanadische Familie teil. Acht Elternpaare sind verwandt, darunter sechs türkische, eine libanesische und eine deutsche Familie. Zum Zeitpunkt dieser Studie waren alle Patienten noch kinderlos.

Tab. 11: Probanden der molekulargenetischen Analyse im *BBS1*-Gen

Probanden	Anzahl	Geschlecht	Herkunft
BBS-Patienten	51	22 ♀ 29 ♂	39 Deutschland, 10 Türkei, 1 Libanon, 1 Kanada
Mütter	32		
Väter	33		
BBS-Geschwister	9	5 ♀ 4 ♂	
Geschwister (ohne BBS)	32		

Der Kontakt zu 35 der 51 Patienten wurde über die Selbsthilfeorganisation Pro Retina Deutschland e. V. hergestellt. Die Studienteilnahme der übrigen 16 Patienten erfolgte durch die Vermittlung von niedergelassenen Ärzten und Kliniken an das Zentrum für Humangenetik in Marburg. Alle Teilnehmer wurden darum gebeten, ein eigene Blutprobe sowie Blut der Eltern und Geschwister zur weiteren Untersuchung an das Zentrum für Humangenetik in Marburg zu senden. Als Kontrollgruppe dienten 50 anonymisierte DNA-Proben von nicht miteinander verwandten männlichen und weiblichen Personen der deutschen Population. Alle Patienten und deren Familien sowie die Kontrollpersonen wurden über die Intention dieser Studie mit einem Informationsblatt aufgeklärt und ausschließlich nach deren Einverständnis in die Studie aufgenommen. Der Studienaufbau wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität in Marburg überprüft und anerkannt.

3.2 Fragebogen zum Bardet-Biedl-Syndrom

Name, Vorname des Patienten:

Geburtsdatum:

Fragebogen ausgefüllt am:

von:

Wann Diagnose Bardet-Biedl-Syndrom erstmals gestellt:

im Alter von:

Welche Diagnosen wurden davor gestellt?

aktuelle Körpergröße

cm

aktuelles Körpergewicht

kg

Mutter:

Körpergröße
Körpergewicht

cm
kg

Vater:

Körpergröße
Körpergewicht

cm
kg

Unsicherheit im Dunkeln

ja / nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

Retinitis pigmentosa

ja / nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

andere Veränderungen des Augenhintergrundes?
(z.B. Netzhautablösung)

Sehvermögen in Prozenten:

%

als blind eingestuft ?

ja / nein

Schielen

ja /nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

Linsentrübungen

ja /nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

besonders kleine Zähne

ja /nein

kariöse Zähne

ja /nein

sonstige Probleme mit Zähnen
(z.B. Fehler der Zahnstellung)

Schwerhörigkeit

ja /nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

Probleme mit Ohren
(z.B. Tubenverschluss)

ja /nein

Herzvergrößerung

ja /nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

angeborener Herzfehler

ja /nein

Welcher Herzfehler?

Bluthochdruck

ja /nein

Diagnose gestellt wann?
Welche Medikamente ?

im Alter von:

Auffälligkeiten der Nieren (z.B. Zysten)

ja /nein

im Alter von:

Niereninsuffizienz

ja /nein

Diagnose gestellt wann?

im Alter von:

Nierentransplantation

ja /nein

im Alter von:

Blasenschwäche

ja /nein

Leberfibrose	ja /nein	Diagnose gestellt wann?	im Alter von:
Diabetes mellitus	ja /nein	Diagnose gestellt wann?	im Alter von:
Hirschsprung Erkrankung	ja /nein	Medikamente? Insulin ?	
kleines männliches Genitale	ja /nein		
Hodenhochstand	ja /nein		
verspätete Pubertät	ja /nein		
Fehlbildungen des weibl. Genitale	ja /nein		
Periodenblutung	ja /nein	regelmäßig ja / nein	
zusätzliche Finger an den Handkanten (6 Finger)	rechte Hand linke Hand	ja / nein ja / nein	
zusätzliche Finger an den Fußkanten (6 Zehen)	rechter Fuß linker Fuß	ja / nein ja / nein	
kleine Hände	ja /nein		
kleine Füße	ja /nein		
sonstige Auffälligkeiten:			
andere Familienmitglieder mit BBS?	ja /nein	Wer?	_____
Bemerkungen:			
Sitzen lernen	Monat / Jahr		
Laufen lernen	Monat / Jahr		
Gleichgewichtsstörungen	ja / nein		
Muskelschwäche (Hypotonie)	ja / nein		
Sätze mit zwei Wörtern	Monat / Jahr		
Sprachprobleme (Stottern, Lispeln oder ähnliches)	ja / nein	Welche?	_____
Sprachentwicklungsverzögerung	ja / nein		
Lernschwierigkeiten	ja / nein		
Kontaktschwierigkeiten	ja / nein		
Konzentrationsschwierigkeiten oder Unruhe	ja / nein		
Welcher Schulabschluss?			
Berufsbezeichnung	_____		
Bemerkungen:	_____		

3.3 Kasuistik des Patienten 2125 (Familie 2038)

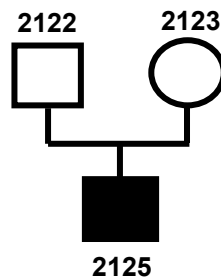


Abb. 7: Stammbaum Familie 2038

Patient 2125 stellt sich persönlich zur humangenetischen Beratung im Zentrum für Humangenetik in Marburg vor. Nach Einwilligung zur Studienteilnahme hatte der Patient den Wunsch nach einem Beratungsgespräch geäußert. Zum Zeitpunkt des Gespräches ist er 32 Jahre alt. Die Eltern des Patienten stammen aus zwei ca. 15 km entfernten Orten an der Grenze zu Ostfriesland. Verwandtschaftsverhältnisse der Familien seiner Eltern sind dem Patienten nicht bekannt. Das Bardet-Biedl-Syndrom ist zuvor in der Familie nicht aufgetreten. Der Patient ist Einzelkind. Die Diagnose Bardet-Biedl-Syndrom wurde im Jahr 1978 im Alter von sieben Jahren durch den Pädiater gestellt.

Patient 2125 wurde im Jahr 1971 nach einem zuvor unkomplizierten Schwangerschaftsverlauf als Frühgeborenes in der 33. SSW mit einem Geburtsgewicht von 2840g geboren. Postnatal zeigten sich eine Cutis laxa, ein weiter Mamillenabstand, eine postaxiale Hexadaktylie beider Füße und Hände, eine muskuläre Hypotonie sowie ein Epicanthus. Zu diesem Zeitpunkt äußerte man den Verdacht auf ein Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom. Die postaxiale Polydaktylie an beiden Händen und beiden Füßen wurde im Säuglingsalter entfernt.

Patient 2125 berichtet, dass die Erstdiagnose einer Retinitis pigmentosa mit 12 Jahren gestellt wurde. In seinem 15. Lebensjahr kam es zu einer linksseitigen Netzhautablösung mit einem progredientem Visusverlust, so dass das linke Auge durch ein Glasauge ersetzt wurde. Die Sehkraft auf dem rechten Auge beträgt aufgrund der Retinitis pigmentosa zurzeit 3%. Der Patient hatte vor dem zunehmenden Visusverlust eine Hemeralopie.

Bereits in der frühen Kindheit kam es zu einer Verzögerung der motorischen Entwicklung. Er erlernte das Laufen mit ungefähr drei Jahren. In der Sprachentwicklung fiel den Eltern schon früh ein Stottern und ein Verschlucken der Endsilben auf, woraufhin eine logopädische Behandlung begonnen wurde. Im Rahmen eines stationären Aufenthalts wegen einer Strabismus-Operation im Jahr 1977 wurde ein IQ-Test durchgeführt. Der damals bestimmte IQ lag bei 0,82. Im Schulalter zeigten sich Probleme mit der Rechtschreibung. Seine schulische Laufbahn endete mit dem Erlangen des Hauptschulabschlusses. Im Anschluss folgte der vierjährige Besuch einer Blindenschule. Dort erlernte der Patient die Brailleschrift, die ihm besonders zu Beginn große Mühen bereitete. Nach Ablauf der vier Jahre auf der Blindenschule entschied er sich für eine Ausbildung zum Telefonisten. In diesem Beruf ist er zum Zeitpunkt des Gespräches tätig.

Nach einem in der Kindheit operativ versorgten Maldescensus testis kam es zu einem verspäteten Eintritt in die Pubertät, die durch monatliche Testosteronspritzen induziert werden konnte. Zusätzlich zu einem Hypogonadismus wurde bei Patient 2125 ein OAT-Syndrom diagnostiziert. Dieses Syndrom beinhaltet das Vorkommen einer verminderten Anzahl (Oligozoospermie), einer verminderten Beweglichkeit (Asthenozoospermie) und einem vermehrten Anteil pathologischer Formen (Teratozoospermie) von Spermatozoen und führt zu einer eingeschränkten Zeugungsfähigkeit.

Patient 2125 berichtet über plötzlich auftretende Angst und Panikattacken sowie häufige Rückenschmerzen infolge einer Osteochondritis deformans. Er führt seinen eigenen Haushalt trotz seiner Sehbehinderung selbständig und ist verlobt. Seine Verlobte ist ebenfalls blind und leidet an einer erblichen Stoffwechselerkrankung, über die er keine näheren Angaben machen kann. Das Paar hat sich gegen eigene Kinder entschieden.

Während des Beratungsgespräches kann der Patient auf die ihm gestellten Fragen präzise und zügig antworten und zeigt darüber hinaus großes Interesse an neuesten Forschungsergebnissen zum Bardet-Biedl-Syndrom.



Abb. 8.1: Patient 2125



Abb. 8.2: Polydaktylien an beiden Händen wurden im Säuglingsalter entfernt



Abb. 8.3: Polydaktylien an beiden Füßen wurden im Säuglingsalter entfernt; auffällig sind die unterschiedlichen Fußlängen

Abb. 8.1 - 8.3: Fotos von Patient 2125

3.3.1 Klinische Symptome des BBS bei Patient 2125

Patient 2125 wurde mit einer postaxialen Polydaktylie an beiden Händen und beiden Füßen geboren. Die Retinitis pigmentosa wurde im Jahr 1983 im Alter von 12 Jahren erstmals symptomatisch und führte zusammen mit einem vorhandenen Glaukom zur Netzhautablösung des linken Auges, das durch ein Glasauge ersetzt wurde. Mit einer Körpergröße von 191 cm und einem Körpergewicht von 116 kg hat der Patient einen Body Mass Index (BMI) von 32, das entspricht einer Adipositas 1. Grades. Er berichtet über eine starke Gewichtszunahme in den letzten zwei Jahren, die Fettverteilung entspricht dem weiblichen Verteilungsmuster. Patient 2125 weist eine mentale Retardierung auf. Ein in der Kindheit durchgeführter Intelligenztest ergab ein unterdurchschnittliches Ergebnis. Bei dem Patienten wurden im Alter von 22 Jahren Nierenzysten beidseits sowie eine Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention diagnostiziert.

Die Diagnosen Hypertonus, Zahnstellungsanomalien, Taubheit und Strabismus zählen zu den Nebenkriterien des BBS, die bei Patient 2125 im Verlauf der Erkrankung aufgetreten sind. Der seit zehn Jahren bestehende arterielle Hypertonus wird mit einem ACE-Hemmer behandelt. Die Hörminderung betrifft das linke Ohr im Frequenzbereich zwischen 60 und 80 Hz.

In Tabelle 12 sind die bei Patient 2125 diagnostizierten Haupt- und Nebensymptome des BBS zusammengefasst.

Tab. 12: Übersicht über die klinischen Symptome des BBS bei Patient 2125

Klinische Symptome des BBS	Patient 2125
Hauptsymptome	
Postaxiale Polydaktylie	+
Retinitis pigmentosa	+
Adipositas	+
Mentale Retardierung	+
Hypogonadismus	+
Nierenerkrankungen	+
Nebenkriterien	
Sprachverzögerung	+
Hörminderung / Taubheit	+
Schielen / Glaukom / Hemeralopie	+
Brachydaktylie	+
Syndaktylie	–
Diabetes mellitus	–
Diabetes insipidus	–
Zahnstellungsanomalie	+
Hyper- / Hypodontismus	+
Herzfehler	–
Leberfunktionsstörungen	–
Hypertonus	+

3.3.2 Molekulargenetische Analyse im *BBS1*- und *BBS6*-Gen bei Patient 2125

Beim Mutationsscreening im *BBS1*-Gen konnten bei diesem Patienten keine Mutationen gefunden werden. Bei einer Analyse im *BBS6*-Gen konnten insgesamt zwei Sequenzvarianten bei Patient 2125 festgestellt werden (Dissertation Frick 2007).

Zum einen wurde die Punktmutation c.110A→G (p.Y37C) in Exon 3 des *BBS6*-Gens gefunden, bei der es zum Basentausch von Adenin (A) zu Guanin (G) an der Stelle 110 in Exon 3 kommt. Dies bewirkt auf der Proteinebene einen Austausch der Aminosäure Tyrosin (Y) zu Cystein (C) an der Stelle 37 des von *BBS6* codierten Proteins. Diese Sequenzvariante konnte sowohl als homozygote als auch als heterozygote Mutation bei BBS-Patienten identifiziert werden (Stone et al. 2000, Katsanis et al. 2000). Zum anderen wurde der in der Literatur beschriebene Polymorphismus c.1595G→T (p.G532V) in Exon 6 des *BBS6*-Gens bei Patient 2125 nachgewiesen (Andersen et al. 2005). Diese Sequenzvariante führt zu einem Austausch der Aminosäure Glycin (G) zu Valin (V) an der Stelle 532 des codierten Proteins. Die Sequenzanalyse zeigte, dass Patient 2125 homozygot für die p.Y37C-Mutation und den Polymorphismus p.G532V ist. Seine Eltern tragen jeweils auf einem Allel (heterozygot) die p.Y37C-Mutation und den Polymorphismus p.G532V. Für die Mutation p.Y37C ist aufgrund des gehäuftten Vorkommens bei BBS-Patienten ein krankheitsauslösender Charakter anzunehmen, während dem Polymorphismus p.G532V wahrscheinlich keine Bedeutung bei der Entstehung der Erkrankung beizumessen ist. Die Familie 2038 ist ein Beispiel für den klassischen autosomal-rezessiven Erbgang beim BBS.

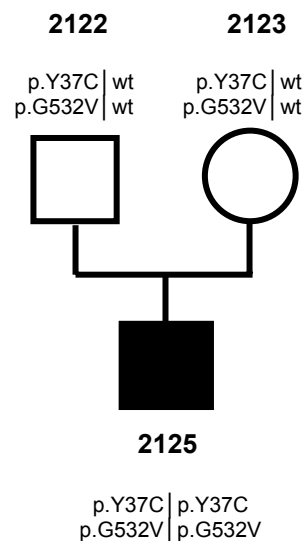


Abb. 9: Stammbaum der Familie 2038 mit den Sequenzvarianten im *BBS6*-Gen

4. Ergebnisse

4.1 Fragebogenauswertung im Blick auf die Hauptsymptome des Bardet-Biedl-Syndroms

Im Folgenden wird die Auswertung des Fragebogens über die klinischen Symptome des BBS mit Schwerpunkt auf den Hauptsymptomen aufgeführt. Es konnten die Ergebnisse aus den Fragebögen von 30 BBS-Patienten (10 ♀ 20 ♂) mit einem Durchschnittsalter von 21 Jahren ausgewertet werden. Bei der Erstdiagnose Bardet-Biedl-Syndrom waren sie durchschnittlich neun Jahre alt.

Tab. 13: Altersverteilung der Fragebogenpatienten (n=30)

Alter	Anzahl Patienten	Geschlecht
0-10 Jahre	2	2 ♀ 0 ♂
11-20 Jahre	15	5 ♀ 10 ♂
21-30 Jahre	8	2 ♀ 6 ♂
31-40 Jahre	3	0 ♀ 3 ♂
41-60 Jahre	2	1 ♀ 1 ♂
insgesamt	30	10 ♀ 20 ♂

Fehlbildungen der Extremitäten

26 der insgesamt 30 Patienten waren zumindest mit einem zusätzlichen Finger oder Zeh geboren. In allen 26 Fällen fand sich eine postaxiale Polydaktylie. Die überzähligen Finger bzw. Zehen wurden in den meisten Fällen im Säuglingsalter operativ entfernt. Vier Patienten (4/30) wiesen keine Veränderungen an den Extremitäten auf.

Augenerkrankungen

Eine Retinitis pigmentosa wurde bei 27 Patienten (27/30) durch einen Augenarzt diagnostiziert. Die ersten Symptome der Retinitis pigmentosa traten vorwiegend im 1.-2. Lebensjahrzehnt auf. Zwei Patientinnen, die bislang keine Augenerkrankungen aufwiesen, befanden sich zum Zeitpunkt der Studie in einem Alter unter neun Jahren. In beiden Fällen könnten die ersten Symptome der Retinitis pigmentosa mit zunehmendem Alter noch zu erwarten sein. Ein Patient hatte keine Retinitis pigmentosa, aber eine Netzhautdystrophie und einen Keratokonus. Bei zwei von 30 Patienten mit Retinitis pigmentosa lag eine hochgradige Sehbehinderung vor. Acht von 30 Patienten waren durch den zunehmenden Visusverlust der Erkrankung bereits erblindet. Bei den übrigen 17 Patienten mit Retinitis pigmentosa war es in einem Alter zwischen 3 und 12 Jahren zum Auftreten der ersten Symptome gekommen.

Körpergewicht

Neunzehn der 30 Patienten dieser Studie waren adipös. Hiervon betroffen waren neun Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren (4 ♂ 5 ♀) und zehn Erwachsene (7 ♂ 3 ♀) über 18 Jahren. Bei den Kindern und Jugendlichen (n=15) fanden sich zwei Patienten mit Normalgewicht (< 90. Perzentile), vier Patienten mit Übergewicht (90.-97. Perzentile) und neun Patienten mit Adipositas (> 97. Perzentile). Bei den Patienten über 18 Jahren hatte nur ein Patient Normalgewicht (BMI < 25), vier Patienten waren übergewichtig (BMI 25-29,9) und zehn Patienten zeigten eine Form der Adipositas von Grad 1 (BMI 30-34,9) bis Grad 3 (BMI > 40). Die Ergebnisse der Gewichtsverteilung sind in Tabelle 14 und 15 dargestellt. Eine Patientin lag mit einem BMI von 59 deutlich über den Normwerten der Allgemeinbevölkerung. Der mittlere BMI unter den männlichen Patienten betrug 30 und bei den Frauen 33.

Tab. 14: Gewichtsverteilung der 15 Patienten < 18 Jahren

Normalgewicht (< 90. Perzentile)	Übergewicht (> 90.-97. Perzentile)	Adipositas (> 97. Perzentile)
2 Pat. 1 ♀ 1 ♂	4 Pat. 1 ♀ 3 ♂	9 Pat. 5 ♀ 4 ♂

Tab. 15: Gewichtsverteilung der 15 Patienten > 18 Jahre

Normalgewicht BMI 19-24,9	Übergewicht BMI 25-29,9	Adipositas Grad 1 BMI 30-34,9	Adipositas Grad 2 BMI 35-39,9	Adipositas Grad 3 BMI >40
1 Pat. 0 ♀ 1 ♂	4 Pat. 0 ♀ 4 ♂	5 Pat. 1 ♀ 4 ♂	3 Pat. 1 ♀ 2 ♂	2 Pat. 1 ♀ 1 ♂

Mentale Fähigkeiten

Eine leichte bis schwere Lernbehinderung konnte in 26 von 30 Fällen diagnostiziert werden. Mit nur wenigen Ausnahmen (n=4), in denen die Betroffenen ihre Schulausbildung mit dem Fachabitur oder der höheren Handelsschule abschließen konnten, erreichten die anderen 87% einen Hauptschulabschluss bzw. Realschulabschluss nur mit Mühe. Dreizehn Patienten hatten ihre Schulausbildung noch nicht beendet oder in einem Fall noch nicht begonnen. Die Patienten mit Lernbehinderungen wurden größtenteils in speziellen Einrichtungen, die im Umgang mit sehbehinderten Menschen geschult waren oder in Sonderschulen und Fördereinrichtungen für Kinder mit Lerndefiziten betreut.

Geschlechtsentwicklung

Alle 16 postpubertären Patienten (♂ > 20 Jahren und ♀ > 18 Jahren) wiesen charakteristische sekundäre Geschlechtsmerkmale auf. Ein Hypogonadismus bei Männern lag in 16 von 20 Fällen vor. Sieben der 20 männlichen Patienten hatten in der Kindheit unter einem Malescensus testis gelitten. Einem Patienten wurde der rechte Hoden entfernt. Die Pubertät begann bei fünf von 20 männlichen Patienten verspätet, in einigen Fällen wurde die Pubertät dann mittels Hormontherapie induziert (n=2).

Bei den weiblichen Patienten fanden sich bei zwei von zehn Fehlbildungen an den Genitalien in Form eines Hydrometrokolpos oder eines Sinus urogenitalis. Diese Symptome sind auch charakteristisch für das McKusick-Kaufman-Syndrom (MKKS), bei dem Mutationen im *BBS6*-Gen (*MKKS*) gefunden wurden (Katsanis et al. 2000). Keiner der Patienten hatte zum Untersuchungszeitpunkt Nachkommen, da sich aber ein Großteil der Patienten bereits im fortpflanzungsfähigen Alter befand, ist eine herabgesetzte Fertilität nicht ausgeschlossen.

Nierenveränderungen

Im untersuchten Patientenkollektiv wurden bei neun von 30 Patienten Veränderungen an den Nieren diagnostiziert. Hierbei handelte es sich vorwiegend um Patienten mit Nierenzysten (n=7) teilweise auch in Kombination mit Niereninsuffizienz (n=5). Patient 2147 erhielt im Alter von 26 Jahren eine Nierentransplantation bei schwerer Niereninsuffizienz. Bei einer Patientin wurde zusätzlich zu Nierenzysten eine Doppelniere diagnostiziert. Aufgrund einer Nierenbeckenausgangsstenose musste bei einer jungen Patientin (vier Jahre) eine Nierenbeckenplastik durchgeführt werden. Einundzwanzig BBS-Patienten wiesen keine Veränderungen an den Nieren auf (n=21).

Tab. 16: Zusammenfassung der klinischen Symptome der 30 BBS-Patienten der Fragebogenstudie

Veränderungen an den Extremitäten		
Postaxiale Polydaktylie (PP)	87%	26/30
PP an allen 4 Extremitäten	37%	11/30
PP nur an den Händen	7%	2/30
PP nur an den Füßen	27%	8/30
PP an jeweils 1 Hand und 1 Fuß	7%	2/30
Brachydaktylie	10%	3/30
Augenveränderungen		
Retinitis pigmentosa	90%	27/30
Strabismus	10%	3/30
Astigmatismus	10%	3/30
Hemeralopie	83%	25/30
Optikusatrophie	7%	2/30
Netzhautablösung	7%	2/30
Zapfen-Stäbchen-Dystrophie	10%	3/30
Übergewicht und Adipositas		
Übergewicht	27%	8/30
Adipositas	63%	19/30
Entwicklungsverzögerung		
Lernschwierigkeiten	87%	26/30
Verhaltensauffälligkeiten	27%	8/30
Sprachschwierigkeiten	17%	5/30
Hypogonadismus bei Männern		
Maldescensus testis	35%	7/20
Verzögerter Pubertätsbeginn	25%	5/20
Fehlbildungen an den weibl. Genitalien		
Vaginalatresie	3%	1/10
Hydrometrokolpos	3%	1/10
Nierenveränderungen		
Niereninsuffizienz, Nierenfehlbildungen	17%	5/30
Transplantation	3%	1/30
Zysten	23%	7/30
Nebenkriterien		
Diverse Zahnprobleme	30%	9/30
Kleine Zähne	23%	7/30
Hörprobleme	20%	6/30
Asthma bronchiale	7%	2/30
Herzerkrankungen	23%	7/30
arterieller Hypertonus	13%	4/30
Diabetes mellitus (NIDDM)	3%	1/30
Neurologische und psych. Veränderungen	13%	4/30

PP = Postaxiale Polydaktylie

NIDDM = non insulin dependent / nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus

4.1.1 Zusammenfassung der Fragebogenauswertung

In dieser Studie wiesen fünf von 30 BBS-Patienten (Patienten 2025, 2094, 2104, 2125, 2141), darunter drei Männer und zwei Frauen im Alter zwischen 17 und 32 Jahren, zum Erhebungszeitpunkt bereits alle sechs Hauptsymptome des BBS auf. Acht Patienten hatten fünf Hauptsymptome, elf Patienten vier Hauptsymptome, fünf Patienten immer noch drei Hauptsymptome und eine Patientin nur zwei Hauptsymptome des Bardet-Biedl-Syndroms.

In Tabelle 17 sind die 30 Patienten mit den sechs Hauptsymptomen des BBS in Beziehung zum Alter und Geschlecht aufgelistet. Die ersten vier der in Tabelle 17 dargestellten Hauptsymptome (Polydaktylie, Retinitis pigmentosa, Adipositas und mentale Retardierung), treten am häufigsten auf. Hypogonadismus und Nierenveränderungen sind nicht als primär charakteristisch für das Bardet-Biedl-Syndrom einzuschätzen.

Tab. 17: Auftreten der Hauptsymptome bei den 30 Patienten der Fragebogenstudie

Zusammenfassung der Hauptsymptome des BBS bei 30 Patienten unter Berücksichtigung des Alters und des Geschlechts und den bisher gefundenen Mutationen. Die 5 Patienten, die alle 6 Hauptsymptome des BBS aufweisen sind fett markiert.

Patient	Geschlecht	Alter	PP	RP	A	MR	HG	N	Mutation
2019	w	46	+	+	+	-	-	-	Ø
2020	w	13	+	+	+	+	-	+	Ø
2025	w	33	+	+	+	+	+	+	Ø
2029	w	17	+	+	+	-	-	-	Ø
2037	w	18	+	+	-	+	+	-	Ø
2059	m	13	+	-	+	+	+	-	Ø
2060	m	16	+	+	+	+	-	-	390RR / <i>BBS1</i>
2084	w	8	-	-	-	+	+	-	390RR / <i>BBS1</i>
2064	w	5	+	-	+	+	-	+	Ø
2065	m	11	+	+	+	+	+	-	Ø
2087	w	14	-	+	+	+	-	-	S80G + T91P / <i>BBS1</i> Y37C / <i>BBS6</i>
2089	m	43	+	+	+	+	+	-	R440X / <i>BBS1</i>
2094	w	18	+	+	+	+	+	+	Ø
2095	m	12	+	+	+	+	+	-	C377_F378delfsX412+ A447T / <i>BBS1</i>
2104	m	25	+	+	+	+	+	+	Ø
2109	m	26	+	+	+	+	+	-	Ø
2112	m	25	+	+	+	+	+	-	Ø
2120	m	15	+	+	+	+	-	-	Ø
2125*	m	32	+	+	+	+	+	+	Y37C+ G532V / <i>BBS6</i>
2131	m	20	+	+	+	+	+	-	Ø
2135	w	16	+	+	+	-	-	-	390RR / <i>BBS1</i>
2138	m	30	+	+	+	-	+	-	Ø
2141	m	20	+	+	+	+	+	+	Ø
2144	m	22	+	+	+	+	-	-	Ø
2147	m	27	+	+	-	-	+	+	Ø
2159	w	22	+	+	+	+	-	-	Ø
2160	w	27	+	+	+	+	-	+	390MR / <i>BBS1</i>
2170	m	12	+	-	+	+	-	-	390RR / <i>BBS1</i>
2173	m	31	-	+	+	+	+	-	Ø
2178	m	14	-	+	+	+	+	-	Ø

Legende

A Adipositas
 RP Retinitis pigmentosa
 PP postaxiale Polydaktylie
 MR Mentale Retardierung
 * Kasuistik Kap. 3.3

HG Hypogonadismus
 N Nierenveränderungen
 + Symptom vorhanden
 - Symptom nicht vorhanden
 Ø keine Mutation gefunden

} Geschwister

4.2 Ergebnisse der molekulargenetischen Analysen im *BBS1*-Gen

4.2.1 Genotyp- und Allelfrequenzen der Punktmutation c.1169T → G (p.M390R) bei BBS-Patienten und Kontrollpersonen

Für die p.M390R-Mutation wurden 51 klinisch diagnostizierte BBS-Patienten und 50 Kontrollpersonen durch einen Restriktionsverdau mit *AvaII* genotypisiert (Abb. 5). Bezüglich der ethnischen Herkunft der Patienten wird auf Tabelle 11 verwiesen. Die 50 Kontrollpersonen sind alle homozygote Träger der Wildtypallele. Bei den BBS-Patienten konnten 88% (45/51) als Träger des homozygoten Wildtyps (390MM), 4% (2/51) als heterozygote Träger der Mutation (390MR) und 8% (4/51) als homozygote Träger der Mutation (390RR) diagnostiziert werden. Die Allelfrequenz für das mutante Allel liegt bei 10%. Alle zehn türkischen Patienten zeigen den homozygoten Wildtyp. Keiner der sechs Mutationsträger von p.M390R weist alle sechs Hauptsymptome des BBS auf (Tabelle 18).

Tab. 18: Ergebnisse der Genotypisierung der Punktmutation p.M390R für heterozygote und homozygote BBS-Patienten in *BBS1*

Familien-Nr.	DNA-Nr.	Familienmitglied	BBS	Fragebogen	Anzahl Hauptsymptome	Genotyp
2025	2081	Vater	–	–	4	390 MR
	2060	Sohn*	+	+		390 RR
	2083	Sohn	–	–		390 MR
	2084	Tochter	+	+	2	390 RR
	2082	Mutter	–	–		390 MR
2043	2142	Sohn	–	–	4	390 MM
	2143	Sohn	–	–		390 MM
	2144	Sohn*	+	+		390 MR
	2145	Mutter	–	–		390 MM
2048	2134	Vater	–	–	3	390 MR
	2136	Sohn	–	–		390 MR
	2135	Tochter*	+	+		390 RR
	2137	Mutter	–	–		390 MR
2053	2166	Vater	–	–	2	390 MR
	2169	Tochter*	+	(+) ²		390 RR
	2168	Tochter	+	(+) ²	3	390 RR
	2167	Mutter	–	–		390 MR
2054	2155	Vater	–	–	5	390 MR
	2160	Tochter*	+	+		390 MR
	2154	Mutter	–	–		390 MM
2057	2170	Sohn*	+	+	3	390 RR

* BBS-Patient in der Studie

390 MM = Wildtyp

390 MR = heterozygot

390 RR = homozygot

BBS + = BBS diagnostiziert

BBS – = kein BBS

Fragebogen +/– = Fragebogen vorhanden ja/nein

² Die Fragebögen der Personen mit der DNA-Nr. 2169 und 2168 lagen zum Zeitpunkt der Fragebogenauswertung noch nicht vor. Sie wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt zugesandt.

4.2.2 Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) im *BBS1*-Gen

Für das Screening auf weitere Mutationen im *BBS1*-Gen wurde die Methode der Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) benutzt. Aufgrund der großen Anzahl an codierenden Bereichen in diesem Gen und dem damit verbundenen hohen Arbeitsaufwand wurden nur diejenigen Exons untersucht, in denen bereits Mutationen gefunden wurden (Mykytyn et al. 2002, 2003; Beales et al. 2003). Somit wurde das Screening im *BBS1*-Gen auf acht Exons beschränkt (Exon 4, 5, 8, 10, 12, 13, 15 und 16). Exon 4 wurde in zwei kleinere Abschnitte (4a und 4b) unterteilt, um die Sensitivität der Methode bei einer Exongröße von 273 bp nicht zu gefährden. Ausgewertet wurde das Laufverhalten der DNA-Fragmente im Gel, aberrante Einzelstränge sowie Doppelstränge.

Es wurden 51 Patienten analysiert. Bei einem aberranten Laufverhalten der DNA-Fragmente und damit dem Verdacht auf das Vorliegen einer Mutation wurden die DNA-Proben der Familienangehörigen des betroffenen Patienten, soweit vorhanden, zur Analyse mit herangezogen. Alle SSCA-Gele wurden bei einer Pufferkammertemperatur von 10°C und 20°C durchgeführt. In dieser Studie wurden nur aberrante Fragmente in der Einzelstrangkonnformation gefunden. Die Doppelstrangkonnformation blieb immer unverändert. Das Vorliegen großer Mutationen wie z.B. Deletionen, Inversionen, Insertionen ist mit der SSCA nicht sicher auszuschließen.

4.2.3 Exon 4

Primerkombination Ex 4a 177F/390R

Bei der SSCA der 51 untersuchten DNA-Proben fanden sich bei keinem der Patienten und den 50 Kontrollpersonen aberrante Banden ($n=0/51$). Da kein Hinweis auf Mutationen in diesem Abschnitt des Exon 4 vorlag, wurden keine der Proben nach Durchführung der SSCA weitergehend analysiert. Auf eine Abbildung der SSCA von Exon 4a wurde bei negativem Screeningergebnis verzichtet.

Primerkombination Ex 4b 270F/508R

Eine DNA-Probe ($n=1/51$) zeigte in einer ersten Untersuchung eine Auffälligkeit. Diese konnte in der Wiederholung der SSCA mit Analyse der Familie reproduziert werden, so dass die DNA der Familie 2033 (vier Personen) von Exon 4b sequenziert wurde. In Abbildung 10 sind die SSCA-Ergebnisse der Familie 2033 im Vergleich zu acht Kontrollpersonen dargestellt.

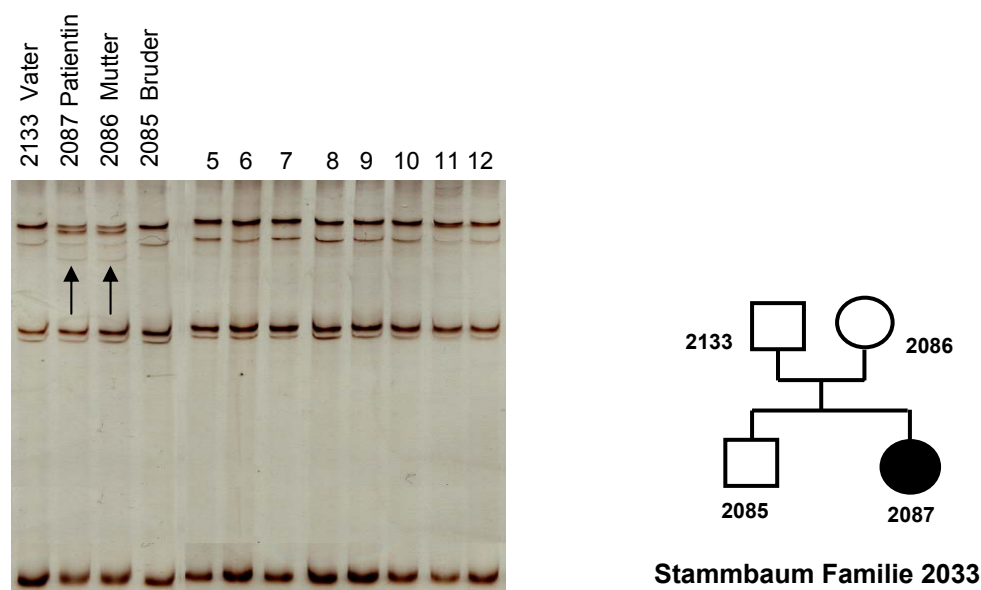


Abb. 10: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS1*, Exon 4 (Primer Ex4b 270F/508R) und Stammbaum der Familie 2033

Bei der SSCA der Familie 2033 zeigen die Mutter 2086 und die BBS-Patientin 2087 im Vergleich zu acht gesunden Kontrollpersonen (Spur 5-12) ein verändertes Laufverhalten in Form von Doppelfragmenten. Die Pfeile deuten auf die aberranten Fragmente bei der Mutter 2086 und der Patientin 2087 hin. Der Vater 2133 und der Bruder 2085 besitzen das Laufverhalten der Wildtypallele.

4.2.4 Exon 5

Primerkombination Ex 5 F/R

Bei der Analyse des Exons 5 zeigte eine DNA-Probe Auffälligkeiten (n=1/51). Die DNA des Patienten 2105 wurde erneut untersucht und wies im Vergleich mit den anderen Proben zwei zusätzliche Fragmente auf. DNA-Proben von Familienangehörigen des Patienten 2105 standen nicht zur Verfügung. Zur weiteren Analyse wurde eine Sequenzierung der DNA des Patienten 2105 und einer Kontrollperson in Exon 5 des *BBS1*-Gens durchgeführt. Das SSCA-Ergebnis von Patient 2105 ist in Abbildung 11 dargestellt.



Abb. 11: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS1*, Exon 5 (Primer Ex 5 F/R)

Die DNA des Patienten 2105 (Fam. 2049) zeigt im SSCA-Gel mit einem zusätzlichen Doppelfragment ein auffälliges Laufverhalten im Vergleich zu den drei Kontrollen (Spur 1, 3 und 4) mit dem Laufverhalten des Wildtypallels.

4.2.5 Exon 8

Primerkombination Ex 8 F/R

In Exon 8 wurde bei keinem der 51 BBS-Patienten oder 50 Kontrollen ein auffälliges Laufverhalten im PAA-Gel gefunden ($n=0/51$). In Abbildung 12 sind die SSCA-Ergebnisse von 12 BBS-Patienten dargestellt. Keine Probe zeigte Veränderungen im Laufverhalten im Vergleich zu den Kontrollen. Abbildung 12 zeigt das zugehörige SSCA-Bild, die Kontrollen sind in dieser Abbildung nicht dargestellt.

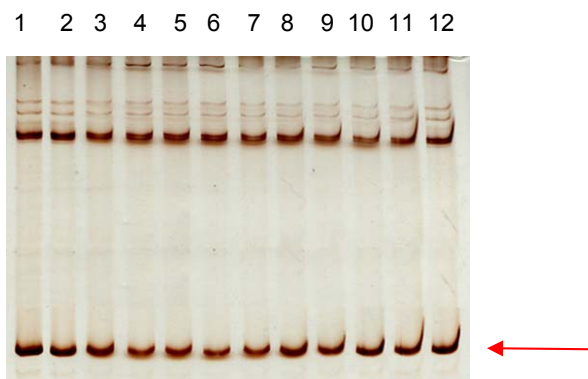


Abb.12: 12% PAA-Gel, Temperatur 20°C, *BBS1*, Exon 8 (Primer Ex 8 F/R)

Die Doppelstrangkongformationen sind mit dem roten Pfeil gekennzeichnet. Es sind die unauffälligen Fragmentmuster von 12 BBS-Patienten in Exon 8 dargestellt.

4.2.6 Exon 10

Primerkombination Ex10 93F/324R

Bei der SSCA der 51 untersuchten DNA-Proben fanden sich bei keinem der Patienten oder Kontrollpersonen aberrierende Fragmente und somit kein Hinweis auf Mutationen in Exon 10 ($n=0/51$). Das SSCA-Bild zu dieser Primerkombination ist nicht dargestellt.

4.2.7 Exon 12

Primerkombination Ex12 19F/388R und 89F/388R

Da in Exon 12 des *BBS1*-Gens eine der am häufigsten vorkommenden BBS-Mutationen gefunden wurde, war es ein Ziel dieser Studie das Vorhandensein dieser Mutation (p.M390R) mit Hilfe der SSCA im vorhandenen Patientenkollektiv zu überprüfen. Es wurden alle 51 BBS-Patienten mit zwei unterschiedlichen Forward Primern (19F und 388F) getestet, der Reverse Primer (388R) blieb in beiden Fällen derselbe. Insgesamt konnten in Exon 12 sieben Patienten mit auffälligem Fragmentmuster im PAA-Gel entdeckt werden (n=7/51).

Während mit dem Primerpaar 89F/388R nur zwei DNA-Proben (n=2/51) ein auffälliges Fragmentmuster bei der SSCA zeigten, konnten mit dem Primerpaar 19F/388R sieben Patienten (n=7/51) mit aberrantem Laufverhalten gesehen werden. Im Verlauf stellte sich heraus, dass sechs dieser sieben Patienten Träger der Punktmutation p.M390R waren. Diese Ergebnisse lagen durch den Restriktionsverdau mit *AvaII* bereits vor (Kap. 4.2.1). Ein unterschiedliches Fragmentmuster im PAA-Gel zwischen dem heterozygoten Zustand des Allels (390MR) und dem homozygoten Zustand (390RR) konnte nicht gefunden werden. Die weitere Analyse der DNA-Probe von Patient 2095 ergab das Vorliegen einer Deletionsmutation in Exon 12. Es wird im Verlauf dieses Kapitels noch ausführlich auf die Ergebnisse von Patient 2095 eingegangen.

In Familie 2025 gibt es zwei homozygote Träger der p.M390R-Mutation (Sohn 2060 und Tochter 2084) und drei heterozygote Träger der Mutation (Vater 2081, Mutter 2082 und Sohn 2083). Dies konnte durch den Restriktionsverdau (Tabelle 18) und durch die Sequenzierung nachgewiesen werden. Bei der SSCA unterscheiden sich die homozygoten Genotypen 390RR nicht von den heterozygoten Genotypen 390MR. Alle Familienmitglieder zeigen im PAA-Gel drei statt zwei Fragmente im Vergleich zu Kontrollpersonen.

Abbildung 13 zeigt das SSCA-Bild zur Primerkombination 19F/388R in Exon 12. Es sind die sechs BBS-Patienten mit dem auffälligen Fragmentmuster und 17 unauffällige Kontrollpersonen sowie die SSCA-Ergebnisse der Familie 2025 dargestellt.

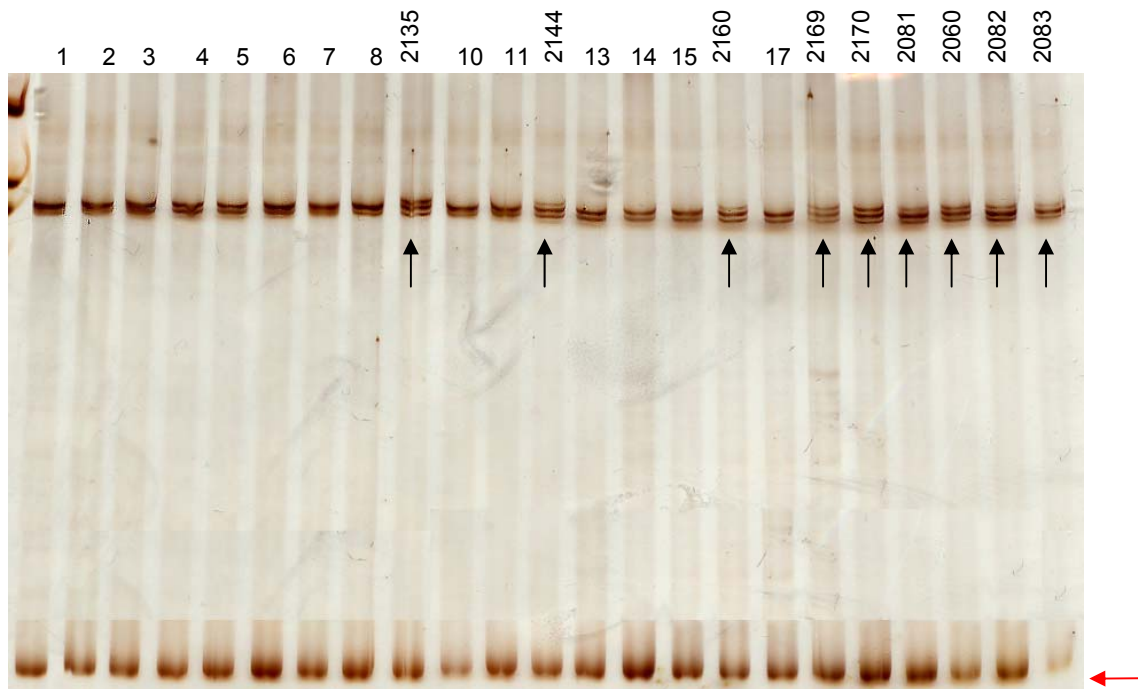


Abb. 13: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS1*, Exon 12 (Primer Ex 12 19F/388R)

Die DNA-Proben der Patienten 2135, 2144, 2160, 2169, 2170 und 2060 sowie der Eltern 2081 und 2082 und des Bruders 2083 von Patient 2060 zeigen in der Einzelstrangkongformation drei Fragmente (schwarze Pfeile). Die homozygoten Genotypen 390RR (2135, 2169, 2170, 2060) sind mit diesem Primerpaar nicht von den heterozygoten Genotypen (2144, 2160, 2081, 2082, 2083) zu unterscheiden. Im Vergleich dazu sind die 17 Kontrollpersonen auf dem gleichen Gel abgebildet, die alle zwei Fragmente in der Einzelstrangkongformation aufweisen. Der rote Pfeil zeigt auf die Doppelstrangkongformation.

Im Gellauf der DNA-Probe des Patienten 2095 konnten im Gegensatz zu allen anderen analysierten DNA-Proben mit beiden Primerpaaren (89F/388R und 19F/388R) zwei zusätzliche aberrante Fragmente gefunden werden. Diese zeigten im Vergleich zur p.M390R-Mutation ein deutlich unterschiedliches Laufverhalten im SSCA-Gel. In Abbildung 14 ist das SSCA-Bild des Patienten 2095 im Vergleich mit drei Kontrollen mit dem Primerpaar 89F/388R dargestellt.



Abb. 14: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS1*, Exon 12 (Primer Ex 12 89F/388 R)

Bei Patient 2095 konnten im Gellauf im Vergleich mit den anderen DNA-Proben (Spur 1, 3 und 4) zwei zusätzliche Fragmente gefunden werden.

Bei der Wiederholung der SSCA für Person 2095 zusammen mit den Familienmitgliedern (2032) ließen sich sowohl beim Vater 2101, als auch bei einem Bruder 2098 des Patienten die beiden zusätzlichen Fragmente darstellen. Die Mutter 2100 und der Bruder 2099 zeigten im PAA-Gel ein unauffälliges Laufmuster.

Abbildung 15 zeigt ein SSCA-Bild mit der Primerkombination 19F/388R. Dargestellt sind drei Familien (2025, 2032 und 2048), Patient 2170 und eine Kontrolle. Aus den Ergebnissen des Restriktionsverdaus mit *Ava*II ist bekannt, dass alle Angehörigen der Familien 2025 und 2048 sowie der Patient 2170 homozygote oder heterozygote Träger der Mutation p.M390R in Exon 12 sind (Tabelle 18). Diese Ergebnisse sind aus dem SSCA-Gel (Abb. 15) nicht ersichtlich. In Familie 2032 zeigten Patient 2095, der Vater 2101 und der Bruder 2098 im Vergleich zur Kontrolle zwei zusätzliche Doppelfragmente. Die PCR-Produkte der Familie 2032 wurden sequenziert und eine heterozygote Deletionsmutation von 5 bp in Exon 12 bei Patient 2095, seinem Vater 2101 und dem Bruder 2098 gefunden.

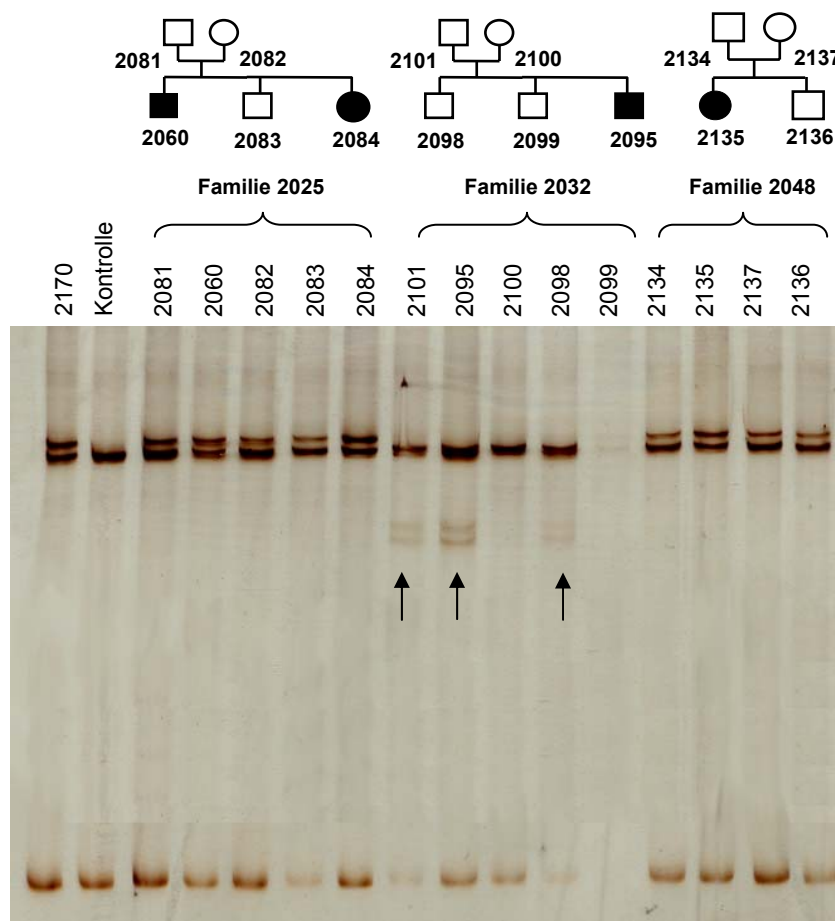


Abb. 15: 12% PAA-Gel, Temperatur 10°C, *BBS1*, Exon 12 (Primer Ex12 19F/388R)

Aus dem SSCA-Gel ist nicht ersichtlich, dass die Patienten 2170, 2060, 2084 und 2135 homozygote Träger der p.M390R-Mutation sind, während die Familienangehörigen 2081, 2082, und 2083 (Familie 2035) sowie 2134, 2137 und 2136 (Familie 2048) heterozygote Träger dieser Mutation sind. Patient 2095 (Familie 2032) und sein Vater 2101 und Bruder 2098 sind heterozygote Träger der 5 bp-Deletion in Exon 12. Die Mutter 2100 und der Bruder 2099 tragen das Wildtypallel wie die Kontrollperson in Spur 2.

4.2.8 Exon 13

Primerkombination Ex13 F/R

Beim Screening in Exon 13 zeigten zwei der 51 analysierten DNA-Proben ($n=2/51$), die Proben von Patient 2095 und Patient 2089, ein unterschiedliches Fragmentmuster im Vergleich zum Rest des Patientenkollektivs und den 50 Kontrollpersonen. Es wurden die Familien der beiden auffälligen BBS-Patienten (Familie 2032 und Familie 2040) zur Untersuchung mit hinzugezogen. In Familie 2032 fanden sich bei Patient 2095, der Mutter 2100 und dem Bruder 2099 bei der SSCA drei statt zwei Fragmente im Vergleich zur Kontrolle. Die übrigen Familienmitgliedern (2101 und 2098) trugen das Wildtypallel. Bei der Untersuchung der Familie 2040 zeigte die Mutter 2090 das gleiche Fragmentmuster wie der Patient 2089. Beim Bruder 2088 konnte das Fragmentmuster des Wildtyps nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte aller Familienmitglieder der Familien 2032 und 2040 wurden sequenziert.

In Abbildung 16 ist das zu Exon 13 zugehörige SSCA-Gel dargestellt. Es sind die SSCA-Läufe der DNA-Proben 2170, 2101, 2098 und 2088 sowie der beiden Kontrollen (Spur 2 und 3) mit dem Fragmentmuster des Wildtyps abgebildet. Das zusätzliche Fragment (roter Pfeil) bei Patient 2170 ist als Artefakt zu werten, da die Sequenzanalyse der DNA von Patient 2170 in Exon 13 das Wildtypallel ergab.

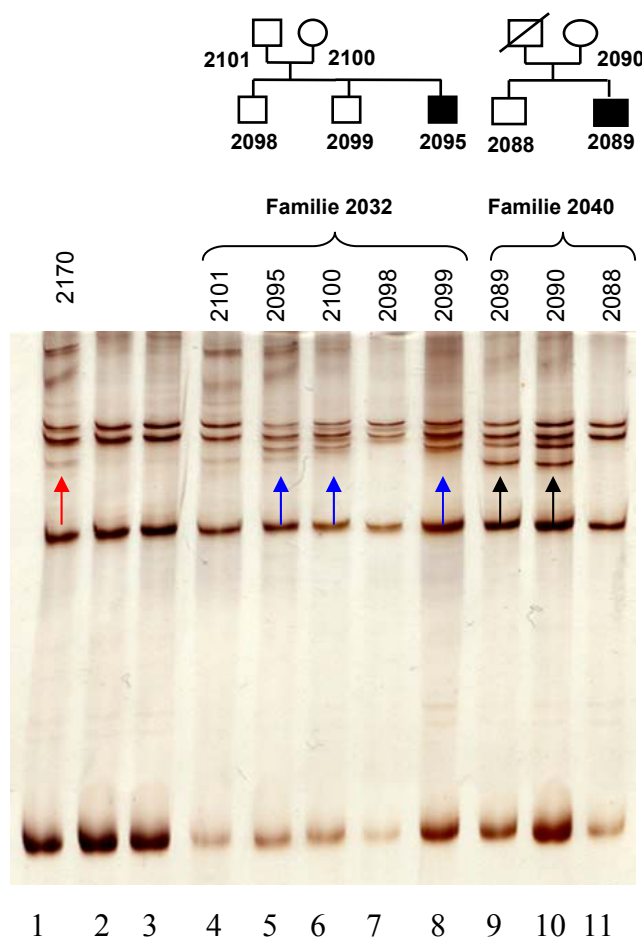


Abb. 16: 12% PAA-Gel, Temp. 10°C, BBS1, Exon 13 (Primer Ex13F/R)

Spur 1 zeigt den Gellauf von Patient 2170 mit einer zusätzlichen Bande, die ein Artefakt darstellt (roter Pfeil). Spuren 2 und 3 zeigen unauffällige Gelläufe. In Familie 2032 finden sich drei statt zwei Fragmente bei Patient 2095, der Mutter 2100 und dem Bruder 2099 (blaue Pfeile). Die DNA-Proben des Patienten 2089 und der Mutter 2090 der Familie 2040 zeigen zwei zusätzliche Fragmente (schwarze Pfeile) im Vergleich zu den Kontrollen in Spur 2 und 3.

4.2.9 Exon 15

Primerkombination Ex15 F/R

Bei der SSCA in Exon 15 fand sich weder bei den untersuchten Proben der BBS-Patienten noch der 50 Kontrollen ein verändertes Laufverhalten im PAA-Gel (n=0/51). Da kein Hinweis auf Mutationen in Exon 15 bei dem untersuchten Patientenkollektiv vorlag, wurde das Exon 15 von keiner der Proben nach Durchführung der SSCA sequenziert.

4.2.10 Exon 16

Primerkombination Ex16 F/R

Alle 51 analysierten Patientenproben und die Kontrollen wiesen ein einheitliches Bild im 12% PAA-Gel auf. Es besteht somit kein Verdacht auf das Vorliegen einer Mutation in diesem Exon (n=0/51). Auf eine Abbildung der SSCA von Exon 16 wurde bei negativem Screeningergebnis verzichtet. Daher erfolgte bei keiner der DNA-Proben der BBS-Patienten oder Kontrollen eine Sequenzierung von Exon 16.

4.2.11 Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse von *BBS1*

Es wurden 51 DNA-Proben von BBS-Patienten und 50 DNA-Proben von Kontrollpersonen auf Sequenzvarianten im *BBS1*-Gen mit Hilfe der SSCA untersucht. Bei allen auffälligen BBS-Patienten wurde eine Wiederholung der SSCA mit den Proben der Familienmitglieder, sofern deren DNA vorhanden war, durchgeführt. In einem nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte der auffälligen Familien sequenziert.

Insgesamt wurden zehn BBS-Patienten mit aberrierenden Fragmenten im SSCA-Gel gefunden, wobei Patient 2095 sowohl in Exon 12 als auch in Exon 13 ein auffälliges Fragmentmuster zeigte. Außer der p.M390R-Mutation bei den Patienten 2060, 2135, 2144, 2160, 2169 und 2170 wurden sieben weitere Sequenzvarianten bei den Patienten 2105, 2087, 2095 und 2089 gefunden. Außer den Patienten 2105 und 2169 hatten die BBS-Patienten mit auffälligem Fragmentmuster bei der SSCA auch an der Fragebogenstudie teilgenommen, wobei nach Auswertung der Ergebnisse der Fragebogen von Patientin 2169 zugesandt wurde.

Die Ergebnisse des Mutationsscreenings mit Hilfe der SSCA sind in Tabelle 19 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 19: Zusammenfassung der SSCA-Ergebnisse von *BBS1*

Exon	Bei der SSCA auffällige BBS-Patienten	Anzahl Patienten
4	2087*	n=1/51
5	2105	n=1/51
8		n=0/51
10		n=0/51
12	2060, 2135, 2144, 2160, 2169, 2170, 2095	n=7/51
13	2089, 2095	n=2/51
15		n=0/51
16		n=0/51

* Bei Patientin 2087 konnten insgesamt drei Sequenzvarianten in Exon 4 diagnostiziert werden.

4.3 Sequenzanalysen im *BBS1*-Gen

Von den zehn BBS-Patienten mit auffälligem Fragmentmuster im SSCA-Gel wurden die DNA-Proben von sieben Patienten und 13 Familienmitgliedern (drei Väter, vier Mütter, eine erkrankte Schwester und fünf gesunde Geschwister) sequenziert. Auf die Sequenzierung der DNA-Proben von 2144, 2160, 2169 und 2170 in Exon 12 wurde nach Durchführung des Restriktionsverdaus mit *AvaII* und sicherem Nachweis der Punktmutation p.M390R verzichtet. Die DNA des Patienten 2170 wurde in Exon 13 sequenziert und ergab keinen auffälligen Befund (Abb. 16).

Insgesamt konnten acht verschiedene Sequenzvarianten gefunden werden. Vier der acht Sequenzvarianten (p.L126L, p.M390R, C377_F378delfsX412 und p.R440X) sind bereits in der Literatur beschrieben worden. Es konnten vier neue Sequenzvarianten im untersuchten Patientenkollektiv entdeckt werden (p.S80G, p.T91P, IVS5+31_32insC und p.A447T).

Es wurden zwei Polymorphismen und sechs Mutationen beim Screening im *BBS1*-Gen gefunden. Bei der Sequenzvariante p.L126L in Exon 4 handelt es sich um einen Polymorphismus (Karmous-Benailly et al. 2005). Der Polymorphismus p.L126L ist eine stille Mutation, die keinen Austausch einer Aminosäure im Protein verursacht. Zusätzlich wurde eine Insertion im Intron 5 (IVS5+31_32insC) entdeckt, die ebenfalls ein Polymorphismus zu sein scheint und aufgrund der Lage im Intron keine Bedeutung bei der Krankheitsauslösung hat.

Die Punktmutationen p.S80G, p.T91P, p.M390R und p.A447T bewirken einen Aminosäureaustausch in dem von *BBS1* codierten Protein und führen dadurch zu einer sinnverändernden Mutation (missense-Mutation). Bei der p.R440X-Mutation kommt es durch den Aminosäureaustausch zur Codierung für ein Stoppcodon und dadurch zum Kettenabbruch bei der Translation (nonsense-Mutation). Es wurde eine Deletionsmutation von 5 bp in Exon 12 (C377_F378delfsX412) gefunden, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt (Frameshift-Mutation).

Patient 2095 und Patientin 2087 sind Träger mehrerer Sequenzvarianten im *BBS1*-Gen. Bei Patient 2095 konnte die Deletionsmutation C377_F378delfsX412 in Exon 12 und die Punktmutation p.A447T in Exon 13 gefunden werden und er ist somit compound-heterozygot im *BBS1*-Gen. Die Patientin 2087 ist Trägerin der Mutationen p.S80G und p.T91P und des Polymorphismus p.L126L, die alle in Exon 4 liegen.

Eine Übersicht der in *BBS1* gefundenen Mutationen findet sich in Tabelle 20. Angegeben ist die Anzahl heterozygoter und homozygoter Träger, die Bezeichnung der jeweiligen Mutation und die zugehörige Literaturstelle. Grundlage aller Auswertungen war die Referenzsequenz AF503941.

Tab. 20: Übersicht der Sequenzvarianten in *BBS1* bei 10 BBS-Patienten

Exon	Patient	DNA-Sequenz Acc.Number AF503941	Protein	Patient homo / hetero	SSCA Abb.	Lit.
4	2087	c.238A→G	p.S80G	0 / 1 hetero/ c.h. ?	10	-
4	2087	c.271A→C	p.T91P	0 / 1 hetero/ c.h. ?	10	-
4	2087	c.378G→A	p.L126L	0 / 1	10	1
5	2105	g.66039659insC	IVS5+31_32insC	0 / 1	11	-
12	2060,2135,2144 2160,2169,2170	c.1169T→G	p.M390R	4 / 2	13	2
12	2095	c.1130_1134del	C377_F378delfsX412	0 / 1(c.h.)	15	3
13	2095	c.1339G→A	p.A447T	0 / 1(c.h.)	16	-
13	2089	c.1318C→T	p.R440X	0 / 1	16	4

1 Karmous-Benailly et al. 2005

2 Mykytyn et al. 2002

3 Mykytyn et al. 20034 Beales et al. 2003

4 Beales et al. 2003

homo = homozygot

hetero = heterozygot

c.h. = compound heterozygot

4.3.1 Punktmutation c.238 A→G in Exon 4 (p.S80G)

Der Basenaustausch von Adenosin (A) zu Guanin (G) an der Stelle 238 in Exon 4 führt zu einem Austausch der Aminosäure Serin (S) zu Glycin (G) an Stelle 80 des von *BBS1* codierten Proteins. Es handelt sich um eine missense-Mutation. Die Patientin 2087 konnte als heterozygote Trägerin dieser Mutation identifiziert werden. Die Eltern (2133 und 2086) sowie der Bruder 2085 tragen das Wildtypallel. Die zu dieser Mutation zugehörigen Sequenzen sind in Abbildung 17 dargestellt.

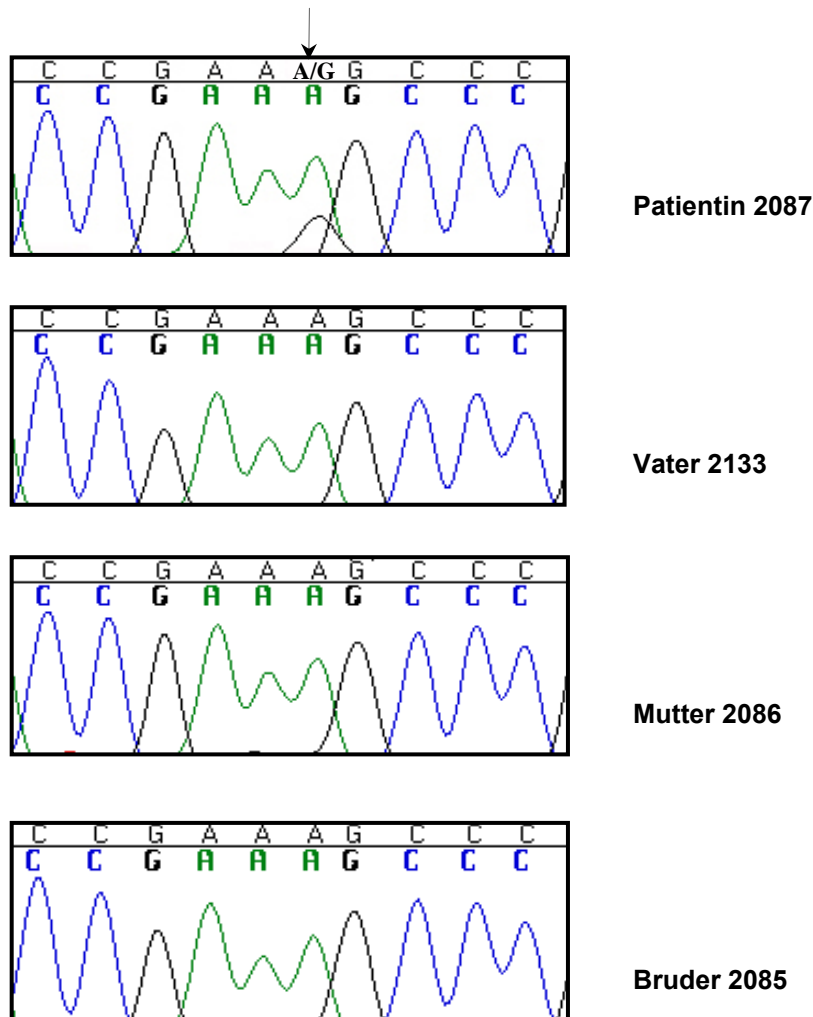


Abb. 17: Sequenzanalyse der Familie 2033 zur Mutation c.238 A→G (p.S80G)

Patientin 2087 ist als einzige der Familie 2033 heterozygote Trägerin der Punktmutation c.238 A→G (p.S80G) (schwarzer Pfeil). Der Vater 2133, die Mutter 2086 und der Bruder 2085 tragen das Wildtypallel.

4.3.2 Punktmutation c.271A→C in Exon 4 (p.T91P)

Die Mutationen c.271A→C (p.T91P) in Exon 4 an Stelle 271 des *BBS1*-Gens führt zu einem Basenaustausch von Adenosin (A) zu Cytosin (C). Dies bewirkt auf der Proteinebene eine Veränderung der Aminosäurenabfolge von Threonin zu Prolin an der Stelle 91. Diese Mutation wurde nur bei Patientin 2087 heterozygot gefunden. Bei keinem der Familienangehörigen konnte diese Mutation nachgewiesen werden. Die Sequenzen der Familie 2033 zu dieser Mutation finden sich in Abbildung 18.

Bei Patientin 2087 konnten insgesamt zwei missense-Mutationen im *BBS1*-Gen diagnostiziert werden. Es handelt sich um die Mutationen p.S80G und p.T91P, die beide in Exon 4 liegen. Es ist nicht geklärt, ob sich diese beiden Sequenzvarianten auf einem Allel (cis-Stellung) oder auf zwei Allelen (trans-Stellung) befinden.

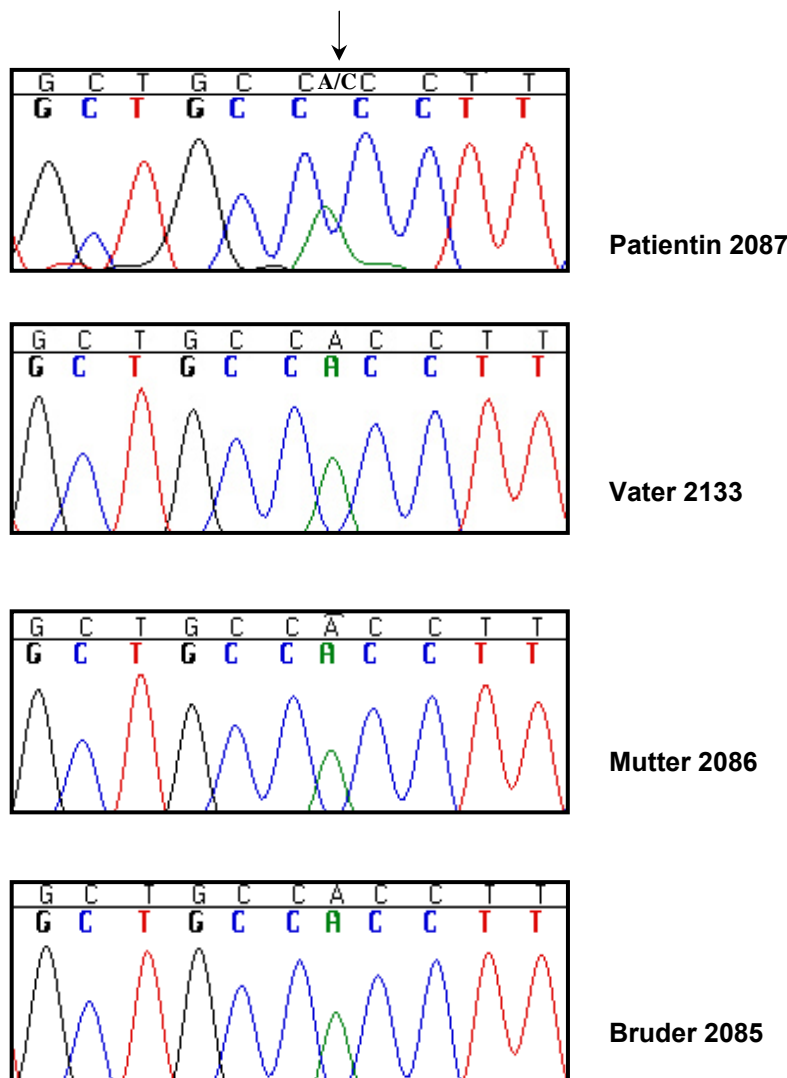


Abb. 18: Sequenzen der Familie 2033 zur Mutation c.271A→C (p.T91P)

Bei Patientin 2087 wurde als einzige der Familie 2033 die Punktmutation p.T91P nachgewiesen. Es ist nicht geklärt, ob sich die p.T91P-Mutation und die p.S80G-Mutation auf einem oder auf zwei Allelen befinden. Die übrigen Familienmitglieder tragen homozygot das Wildtypallel.

4.3.3 Polymorphismus c.378G→A in Exon 4 (p.L126L)

Patientin 2087 ist als einzige der 51 BBS-Patienten ($n=1/51$) und der 50 Kontrollpersonen Trägerin der Sequenzvariante c.378G→A. Die Base an der Stelle 378 in Exon 4 ist die dritte Base im codierenden Triplet. Ihre Bindung ist schwächer als die feste Wasserstoffbrückenbindung der 1. und 2. Base der mRNA und lässt wegen ihrer besonderen sterischen Anordnung auch alternative Paarungen zu (Wobble-Paarungen). Auf diese Weise können Codons, die für dieselbe Aminosäure codieren und sich nur in ihrem dritten Nukleotid unterscheiden, oft durch dieselbe tRNA entziffert werden. Der Austausch von Guanin (G) zu Adenin (A) an der Stelle 126 der Proteinsequenz führt daher nicht zu einer Veränderung des BBS1-Proteins. Die Aminosäure Leucin (L) bleibt trotz verändertem Nukleotid erhalten. Diese Sequenzvariante wurde in der Literatur als Polymorphismus beschrieben (Karmous-Benailly et al. 2005). Bei dieser Untersuchung zeigte sich der Polymorphismus c.378G→A jeweils auf einem Allel bei der Patientin 2087 und ihrer Mutter 2086. Der Vater 2133 und der Bruder 2085 tragen homozygot das Wildtypallel. Die Sequenzen der Familie 2033 sind in Abbildung 19 dargestellt.

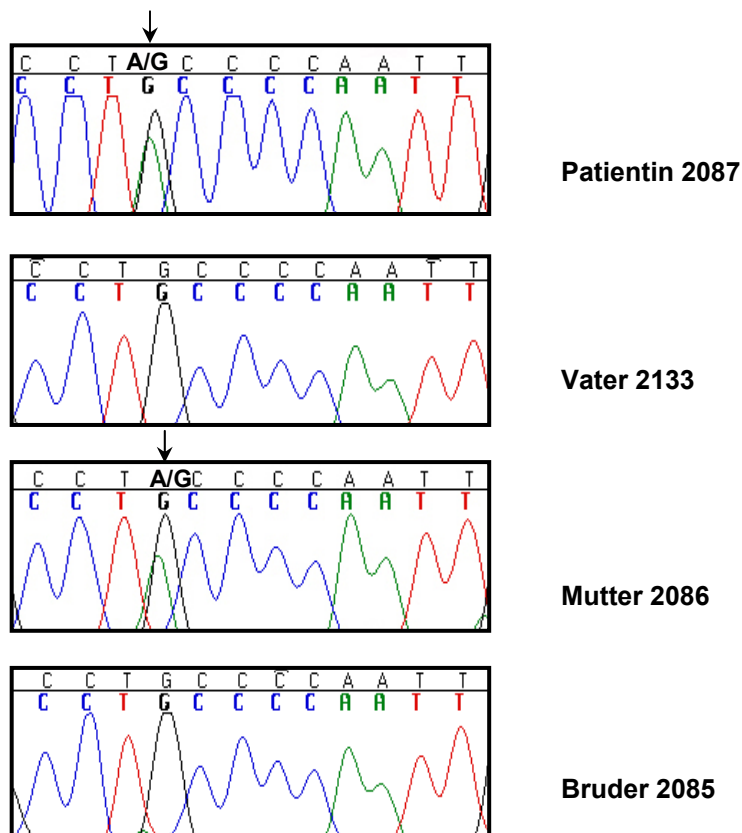


Abb. 19: Sequenzen der Familie 2033 zur Mutation c.378G→A (p.L126L)
 Patientin 2087 und die Mutter 2086 sind beide heterozygote Träger der Punktmutation c.378G→A (p.L126L) (schwarzer Pfeil). Der Vater 2133 und der Bruder 2085 sind Träger des Wildtypallels.

4.3.4 Sequenzvarianten in Exon 4

Patientin 2087 ist Trägerin von zwei Punktmutationen (p.S80G und p.T91P) und dem Polymorphismus p.L126L in Exon 4 des *BBS1*-Gens. Während dem Polymorphismus keine krankheitsauslösende Bedeutung zukommt, ist für die beiden Punktmutationen eine pathogene Bedeutung anzunehmen. Es ist nicht geklärt, ob sich diese beiden Mutationen auf einem Allel oder zwei Allelen befinden. Zwei zusammen im gleichen Individuum vorkommende verschiedene Mutationen des gleichen Gens können je nach Lage zueinander unterschiedliche Auswirkungen haben. Liegen sie auf verschiedenen Chromosomen (d. h. in trans-Stellung), werden zwei (verschiedene) mutierte Genprodukte gemacht. Liegen dagegen beide auf dem gleichen Chromosom (d.h. in cis-Stellung), wird ein normales und ein (an zwei Stellen) mutiertes Produkt entstehen. Abbildung 20a zeigt vier verschiedene Möglichkeiten der Lage der drei Sequenzvarianten in Exon 4 bei Patientin 2087 auf.

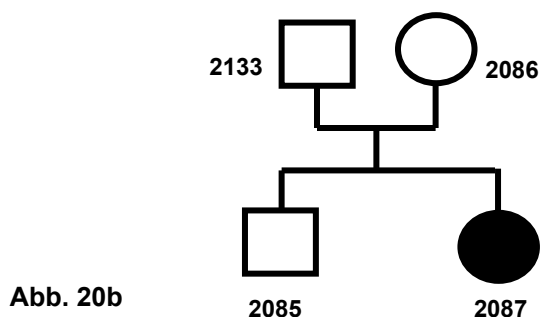
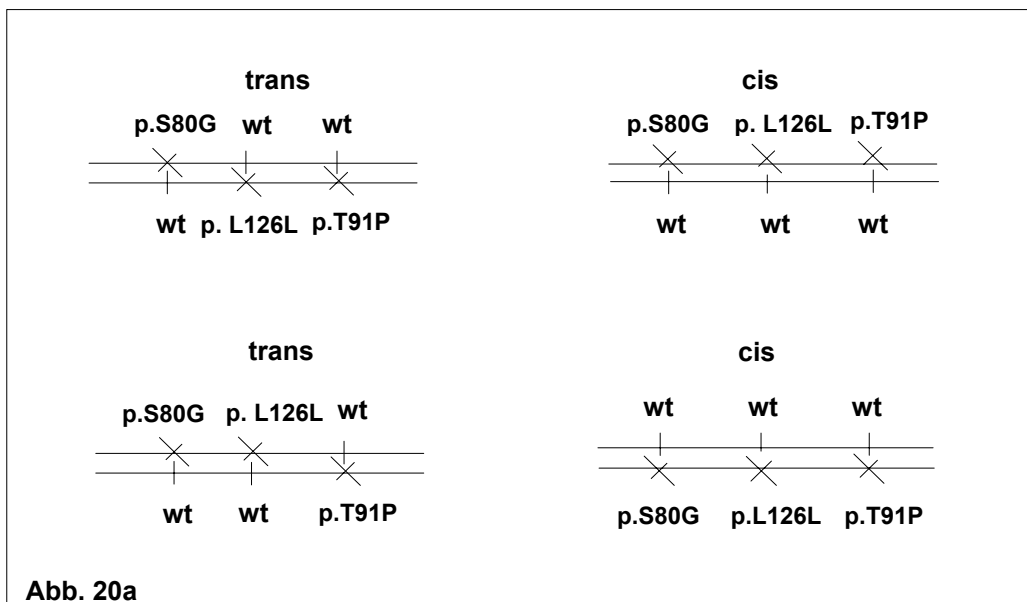


Abb. 20a + b : Möglichkeiten der Lage der Sequenzvarianten bei Patientin 2087 in Bezug auf die trans- bzw. cis-Stellung mit Stammbaum der Familie 2033

Patientin 2087 ist als einzige der Familie 2033 am BBS erkrankt und Trägerin von drei verschiedenen Sequenzvarianten in Exon 4 des *BBS1*-Gen. Der Polymorphismus p.L126L wurde auch bei der Mutter 2086 diagnostiziert und hat für die Entstehung der Erkrankung keine Bedeutung. Die beiden Punktmutationen p.S80G und p.T91P könnten bei Patientin 2087 sowohl auf einem Allel als auch auf zwei Allelen liegen. Vier verschiedene Möglichkeiten der Lage der Sequenzvarianten sind in Abb. 20a dargestellt. Eine weitere Analyse der Familienmitglieder kann zur Lösung beitragen.

4.3.5 Insertionspolymorphismus in Intron 5 (IVS5+31_32insC)

Bei Patient 2105, mit einem auffälligen Fragmentmuster bei der SSCA (Abb. 21), konnte als einziger der 51 Patienten ($n=1/51$) ein Insertionspolymorphismus in Intron 5 festgestellt werden. Zwischen der 31. und 32. Base im Intron 5 kommt es zu einer Insertion eines Cytosins (C) in einer C-Abfolge und damit zur Verschiebung des Leserasters. Der auf diese Sequenzvariante folgende Sequenzabschnitt ist für die Analysesoftware schlechter lesbar. Aufgrund der Lage im Intron hat diese Sequenzvariation vermutlich keine Bedeutung bei der Krankheitsauslösung. Das Vorliegen eines Polymorphismus ist anzunehmen. Patient 2105 ist heterozygoter Träger dieser Sequenzvariante. Da außer dem Patienten 2105 keine DNA von Familienangehörigen zur Untersuchung zur Verfügung stand, ist zum Vergleich in Abbildung 21 der Sequenzausschnitt einer gesunden Kontrolle dargestellt.

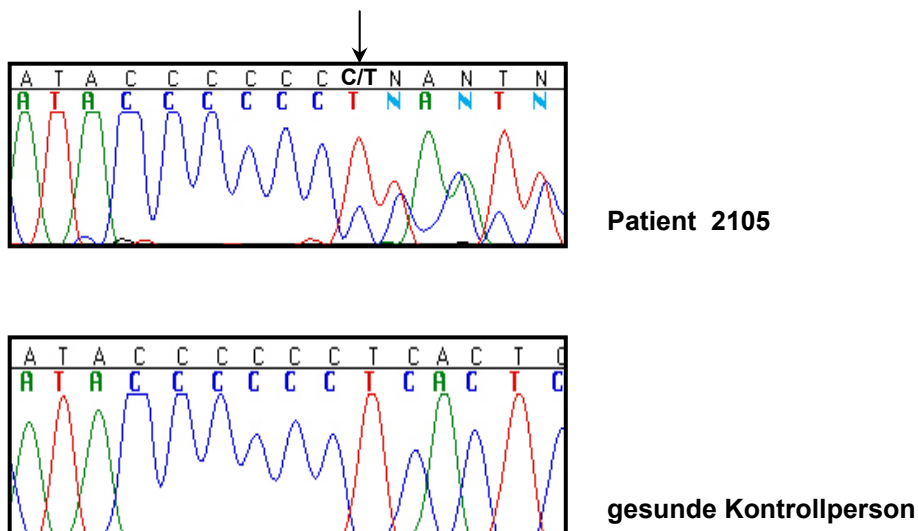


Abb. 21: Sequenzen von Patient 2105 und einer Kontrollperson

Patient 2105 ist heterozygoter Träger des Insertionspolymorphismus (IVS5+31_32insC) in Intron 5 (schwarzer Pfeil). Zum Vergleich ist die Sequenz einer gesunden Kontrollperson dargestellt.

4.3.6 Punktmutation c.1169T→G in Exon 12 (p.M390R)

Die Ergebnisse des SSCA-Screenings in Exon 12 konnten bezüglich der Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten Trägern der p.M390R-Mutation in Exon 12 kein eindeutiges Ergebnis liefern. Wie durch den Restriktionsverdau mit *Ava*II bekannt ist, sind sechs der 51 Patienten (n=6/51) Träger der p.M390R-Mutation in Exon 12. Davon sind zwei Patienten heterozygot (n=2) und vier Patienten homozygot (n=4) von der Mutation betroffen. Von diesen sechs BBS-Patienten wurden exemplarisch zwei Patienten (2060 und 2135) und ihre Familienangehörigen in Exon 12 sequenziert. Die bekannte Punktmutation c.1169T→G (p.M390R) konnte in beiden Fällen nachgewiesen werden.

Im Verlauf wurde das Screening auf diese Mutation bei allen 51 BBS-Patienten eindeutiger, einfacher und kostengünstiger durch die Restriktionsspaltung der DNA-Proben mit *Ava*II als durch die SSCA durchgeführt. Stellvertretend für die sechs Patienten, die Träger dieser Mutation sind, ist die Sequenz des homozygot betroffenen Patienten 2060 und einer gesunden Kontrollperson in Abbildung 22 dargestellt. Man sieht die Veränderung des Triplets ATG → AGG an Stelle 1169 des *BBS1*-Gens.

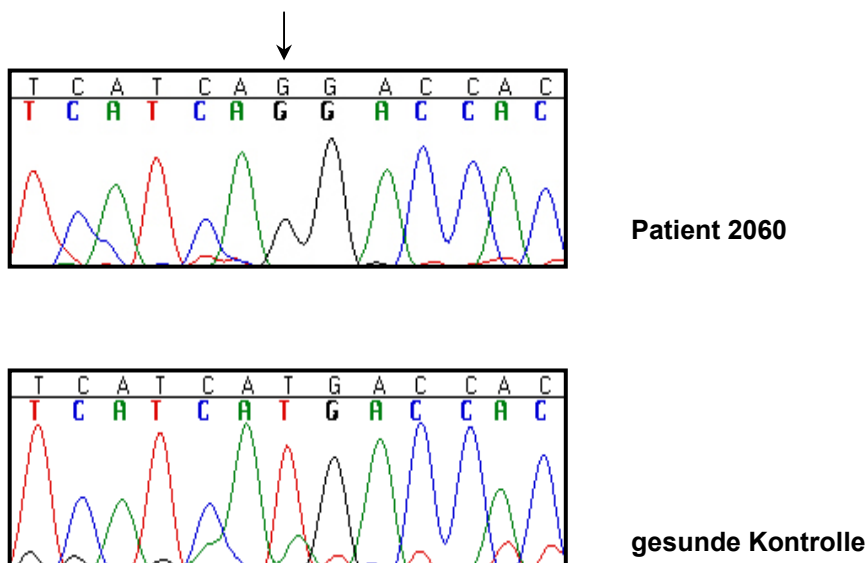


Abb. 22: Sequenzen des Patienten 2060 und einer gesunden Kontrolle

Patient 2060 ist homozygoter Träger der Punktmutation c.1169T→G (p.M390R) in Exon 12 (schwarzer Pfeil). Die gesunde Kontrolle zeigt die Sequenz des homozygoten Wildtyps.

4.3.7 Mutationen im *BBS1*-Gen bei Familie 2032

4.3.7.1 Frameshift-Mutation c.1130_1134del in Exon 12 (C377_F378delfsX412)

Da die SSCA-Ergebnisse (Abb. 14 und 15) von Patient 2095 in Exon 12 auffällig waren, erfolgte die Sequenzierung der DNA-Probe zusammen mit den Familienangehörigen. Bei Patient 2095 konnte in Exon 12 auf einem Allel eine Deletion von 5 bp an der Stelle c.1130_1134del gefunden werden. Diese führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zum Auftreten eines Stoppcodons und dadurch zur Frameshift-Mutation C377_F378delfsX412. Der darauf folgende Sequenzabschnitt ist für die Analysesoftware nur noch schlecht lesbar. Diese Mutation wurde in der Literatur von Mykytyn und Mitarbeitern erstmals beschrieben (Mykytyn et al. 2003). Bei der Untersuchung der Familienangehörigen konnte die Frameshift-Mutation heterozygot auch bei dem Vater 2101 und dem Bruder 2098 nachgewiesen werden. Die Mutter 2100 und der Bruder 2099 tragen das Wildtypallel. Die Sequenzen der Familie 2032 sind in Abbildung 23 dargestellt.

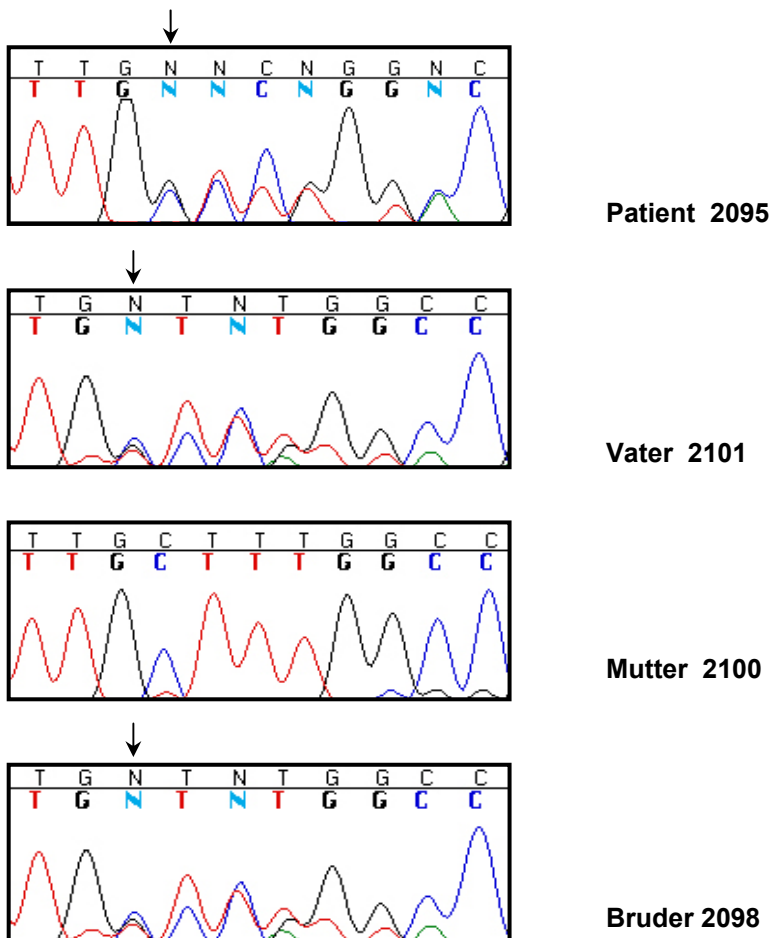


Abb. 23: Sequenzen der Familie 2032

Patient 2095, der Vater 2101 sowie der Bruder 2098 sind heterozygote Träger der Deletion von 5 bp (c.1130_1134del), die zur Frameshift-Mutation C377_F378delfsX412 in Exon 12 führt. Die Mutter 2100 und der Bruder 2099 sind Träger des Wildtypallels.

4.3.7.2 Punktmutation c.1339G→A in Exon 13 (p.A447T)

Bei der SSCA der Familie 2032 in Exon 13 fiel ein zusätzliches Fragment im Vergleich zu den Trägern des Wildtypallels auf (Abb. 16). Die Sequenzanalyse ergab bei Patient 2095 die Punktmutation c.1139 G→A (p.A447T) in Exon 13. Die letzte Base des Exons 13, Guanin (G), wird durch ein Adenosin (A) an der Stelle 1339 des von *BBS1* codierten Proteins ersetzt. In der Aminosäuresequenz kommt es dabei zu einem Austausch der Aminosäure Alanin (A) gegen Threonin (T). Diese Mutation wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. In Familie 2032 konnte diese Mutation außer bei Patient 2095 auch bei der Mutter 2100 und dem Bruder 2099 auf einem Allel nachgewiesen werden.

In Abbildung 24 ist der Stammbaum der Familie 2032 mit den zwei Mutationen im *BBS1*-Gen dargestellt. Die Sequenzen der Familie 2032 zur Punktmutation c.1339 G → A (p.A447T) in Exon 13 finden sich in Abbildung 25. Patient 2095 ist compound-heterozygoter Träger beider Mutationen im *BBS1*-Gen und als einziger der Familie 2032 vom BBS betroffen.

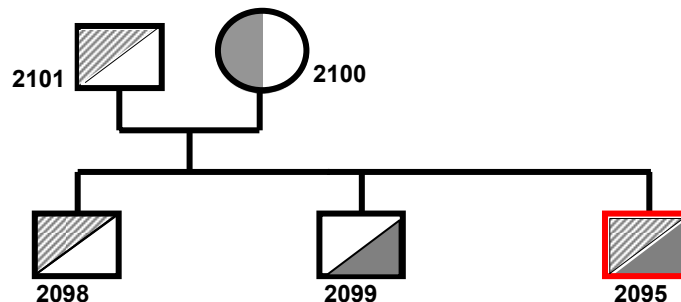


Abb. 24: Stammbaum Familie 2032 mit Mutationen im *BBS1*-Gen

Der Vater 2101, der Bruder 2098 und Patient 2095 sind heterozygote Träger der Frameshift-Mutation C377_F738delfsX412 in Exon 12. Bei der Mutter 2100, dem Bruder 2099 und dem Patient 2095 konnte die Punktmutation p.A447T in Exon 13 auf einem Allel nachgewiesen werden. Patient 2095 ist compound-heterozygoter Träger beider Mutationen im *BBS1*-Gen und als einziger der Familie 2032 vom BBS betroffen (roter Rahmen).

Symbolerklärung

heterozygoter Träger der Frameshift-Mutation C377_F738delfsX412 in Exon 12

heterozygoter Träger bzw. Trägerin der Punktmutation p.A447T in Exon 13

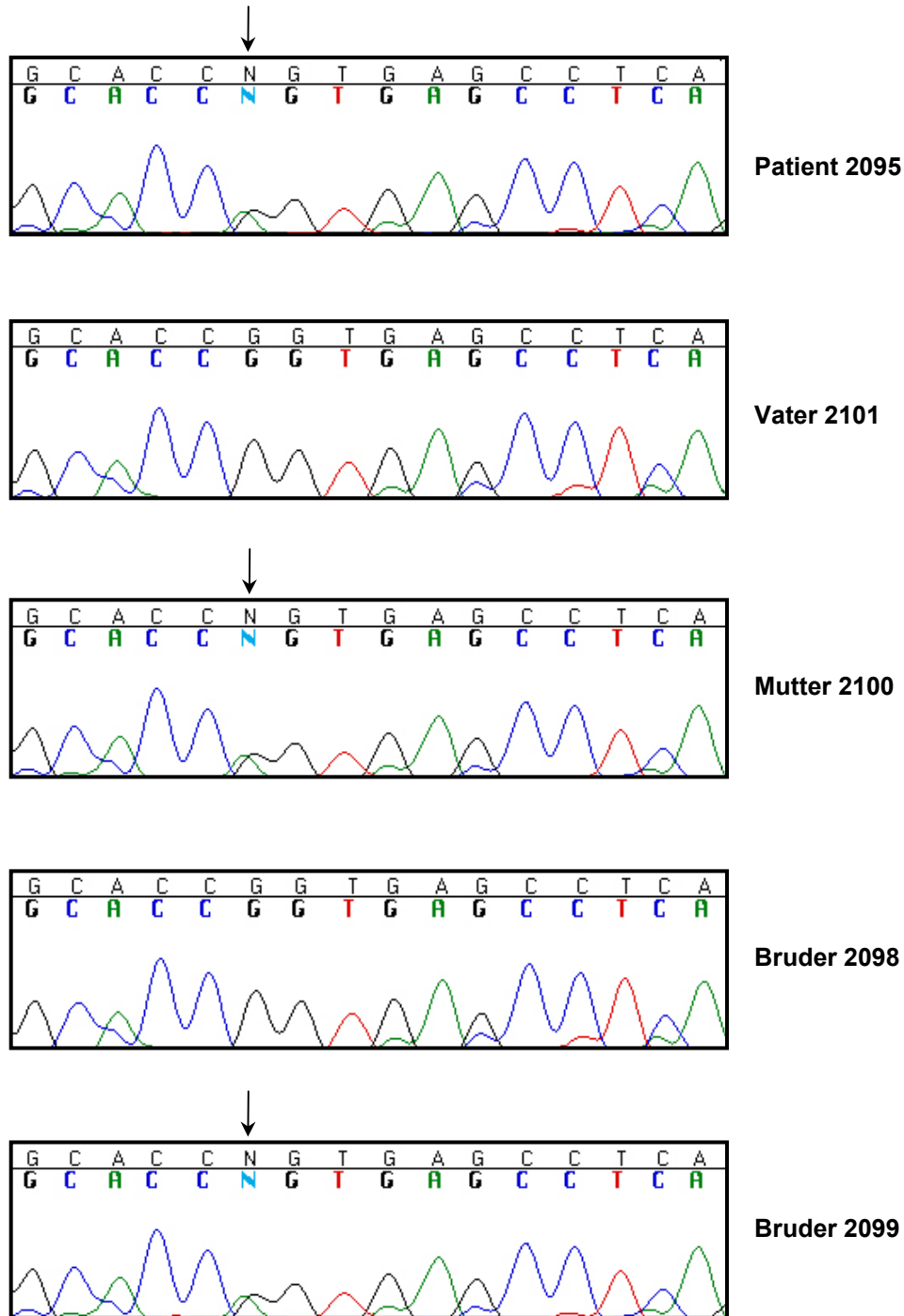


Abb. 25: Sequenzen von Familie 2032 in Exon 13

Patient 2095, die Mutter 2100 sowie der Bruder 2099 sind heterozygote Träger der Punktmutation c.1339G→A (p.A447T) (schwarzer Pfeil). Der Vater 2101 und der Bruder 2098 sind Träger des Wildtypallels.

4.3.8 Punktmutation c.1318C→T in Exon 13 (p. R440X)

Patient 2089 fiel bei der SSCA durch zwei zusätzliche Fragmente im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 16). Nach der Sequenzanalyse der DNA von Patient 2089 wurde ein Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an der Stelle 1318 in Exon 13 gefunden. Dieser führt zum Auftreten des Basentriplets TGA statt CGA. Statt der Aminosäure Arginin (R) tritt an die Stelle 440 des von *BBS1* codierten Proteins das Triplet TGA, welches für ein Stoppcodon codiert und damit einen Kettenabbruch bewirkt. Es handelt sich um eine nonsense-Mutation. Diese Mutation wurde von Beales und Mitarbeitern erstmals beschrieben (Beales et al. 2003).

Patient 2089 ist heterozygoter Träger dieser Mutation, ebenso auch seine Mutter 2090. Der Bruder des Patienten 2088 trägt das Wildtypallel. Der Vater der Familie war bereits verstorben und stand daher nicht zur Untersuchung zur Verfügung.

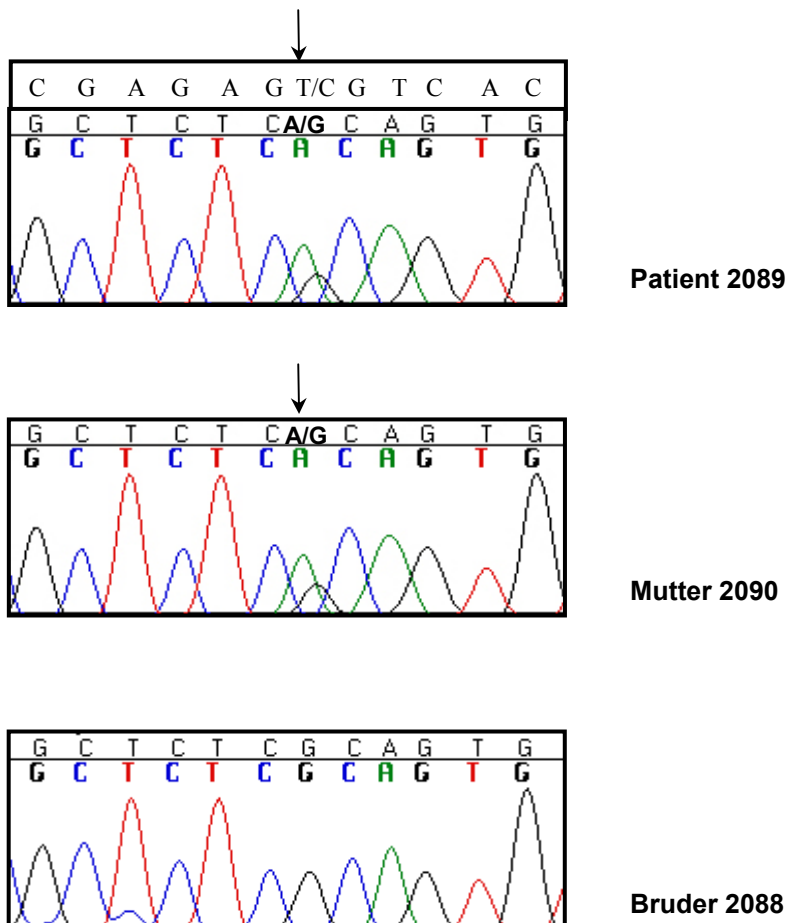


Abb. 26: Sequenzen von Familie 2040

Patient 2089 und seine Mutter 2090 sind heterozygote Träger der Punktmutation c.1318C→T (p.R440X) in Exon 13 (schwarzer Pfeil). Der Bruder 2088 trägt das Wildtypallel. Alle Sequenzen sind mit dem 13 R-Primer dargestellt. Die oberste Zeile der Sequenz von Patient 2089 zeigt den entsprechenden Sequenzausschnitt mit dem 13 F-Primer.

5. Diskussion

5.1 Fragebogen

5.1.1 Die klinischen Symptome des BBS im Vergleich zur Literatur

Seit Ammann und Mitarbeiter 1970 einen Artikel über das Bardet-Biedl-Syndrom veröffentlichten und im Gegensatz zu Solis-Cohen und Weiß (1925) das Bardet-Biedl-Syndrom als eigenständiges Krankheitsbild gegenüber dem Laurence-Moon-Syndrom betrachteten, werden in der Literatur regelmäßig Forschungsergebnisse zu dieser Fragestellung veröffentlicht (Ammann et al. 1970, Solis-Cohen et al. 1925).

Die größte und umfassendste klinisch deskriptive Studie an BBS-Patienten wurde 1999 von Beales und Mitarbeitern in London durchgeführt (Beales et al. 1999). Um die Ausprägung des Phänotyps der Erkrankung bei deutschen BBS-Patienten zu erfassen und mit den Daten aus der Literatur zu vergleichen, wurde ein Fragebogen über die klinischen Symptome des BBS entworfen und an alle teilnehmenden BBS-Patienten dieser Studie versandt. Es konnten die Fragebögen von insgesamt 30 Patienten, davon 10 weibliche und 20 männliche, ausgewertet werden. Ein Blick auf Tabelle 21 zeigt, dass sich die Ergebnisse, abgesehen von der kleineren Patientenanzahl, mit denen größerer Studien im Einklang befinden.

Tab. 21: Häufigkeiten der Hauptsymptome in dieser Studie im Vergleich zu anderen Studien

Studie	Pers.	Geschl.	PP	RP	A	MR	HG	N
Bell et al. 1958	273	113 ♀ 160 ♂	73%	93%	91%	87%	74%	k. A.
Klein et al. 1969	48	20 ♀ 28 ♂	69%	91%	96%	79%	86%	k. A.
Green et al. 1989	32	18 ♀ 14 ♂	58%	100%	88%	41%	88%	95%
Beales et al. 1999	109	47 ♀ 62 ♂	68%	93%	72%	72%	96%	46%
Diese Studie	30	10 ♀ 20 ♂	86%	90%	90%	87%	80%	30%

PP Postaxiale Polydaktylie
RP Retinitis pigmentosa
A Adipositas

MR Mentale Retardierung
HG Hypogonadismus
N Nierenveränderungen

5.1.2 Geschlechterverteilung

In dieser Studie lag ein Frauen/Männer-Verhältnis von 1:2 vor. Dies entspricht ungefähr den Ergebnissen anderer Studien, bei denen gleichfalls ein Überwiegen der männlichen Patienten zu finden ist (Bell J. 1958, Klein und Ammann et al. 1969, Beales et al. 1999). Allerdings war bei Green und Mitarbeitern die Anzahl an weiblichen Patienten etwas größer als die der männlichen Patienten (Green et al. 1989). Eine Erklärung für den Unterschied im Geschlechterverhältnis gibt es zum

derzeitigen Stand der Forschungen nicht. Es bleibt abzuwarten, ob die Erforschung der molekularen Grundlage des BBS weitere Erkenntnisse hierzu bringen wird.

5.1.3 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung Bardet-Biedl-Syndrom erfolgte in dieser Studie im Durchschnitt in einem Alter von neun Jahren. Die ersten Symptome der Retinitis pigmentosa traten bei den 30 Patienten um das 10. Lebensjahr erstmalig auf. Die Retinitis pigmentosa ist eines der am konstantesten auftretenden Hauptsymptome des BBS (Klein und Ammann et al. 1969). Häufig kann erst durch das Auftreten der Retinitis pigmentosa um das 10. Lebensjahr der aus den verschiedenen Haupt- und Nebensymptomen hervorgerufene Phänotyp dem BBS zugeordnet werden. Ein Grund für die späte Diagnosestellung dürfte die große Anzahl an genetischen Erkrankungen sein, die ein oder mehrere Symptome des BBS beinhalten. Eine Übersicht der häufigsten Differentialdiagnosen zum BBS gibt Tabelle 22.

Tab. 22: Differentialdiagnosen zum Bardet-Biedl-Syndrom

Erkrankung	OMIM-Nr.	Gen-Locus	Erbgang	Symptome
Laurence-Moon-Syndrom	245800	2q31?	autosomal-rezessiv	geistige Retardierung Adipositas Beginn im 1. - 2. LJ Progressive Ataxie Spastische Paraplegie Hypogenitalismus Retinopathie und Hemeralopie
Pallister-Killian-Syndrom	601803	12p	Neumutation	muskuläre Hypotonie Sprachentwicklungsverzögerung Polydaktylie Nierenfehlbildungen Genitalfehlbildungen Faziesauffälligkeiten
Pallister-Hall-Syndrom	146510	7p13	autosomal-dominant	Hypogenitalismus Brachydaktylie / Polydaktylie Syndaktylie Nierendysplasien Hypothalamische Hamartome Kongenitale Herz- und Lungenerkrankungen
Meckel-Syndrom Typ 1,2,3,4	249000 Typ 1 603194 Typ 2 607361 Typ 3 611134 Typ 4	17q23 11q13 8q21.13 12q21.3	autosomal-rezessiv	ZNS-Entwicklungsstörungen Leber- und Nierenzysten Polydaktylie Gaumenspalte Herzfehlbildungen

Polydaktylie

Wie in den Arbeiten von Beales und Mitarbeitern sowie in den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen beschrieben, wurde auch in dieser Studie das Auftreten überzähliger Zehen (postaxial) häufiger festgestellt als das Auftreten zusätzlicher Finger (Green et al. 1989, Klein und Ammann et al. 1969, Beales et al. 1999). Eine postaxiale Polydaktylie an den Zehen trat bei den 30 Patienten dieser Studie bei insgesamt acht Patienten (27%) auf und damit fast viermal so häufig wie an den Händen 2/30 (7%). Allerdings hatten 11 von 30 Patienten (37%) eine Polydaktylie sowohl an den Füßen als auch an den Händen. Im Vergleich hierzu fanden Klein und Ammann 1969 in ihrer Studie bei 29 von 33 Patienten (88%) eine Polydaktylie nur an den Füßen, bei 22 von 33 Fällen (67%) eine Polydaktylie an den Händen und bei 10 von 33 Patienten (30%) eine Polydaktylie sowohl an den Händen als auch an den Füßen (Klein und Ammann 1969). Insgesamt trat eine Polydaktylie im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Tab. 21) in dieser Studie mit 86% (26/30) besonders häufig auf.

Diese überzähligen Finger bzw. Zehen werden meist im Säuglings- bzw. Kleinkindalter operativ entfernt. Außer aus kosmetischen Gründen sollte die Operation unbedingt in einem frühen Alter erfolgen, da im Verlauf andernfalls die Funktion der Hände beeinträchtigt werden kann oder die Patienten später in keine handelsüblichen Schuhe passen.

Retinitis pigmentosa

Augenärzte stellten fest, dass bei BBS-Patienten bis zu einem Alter von sieben bis acht Jahren Elektretinogramme (ERG) und visuell evozierte kortikale Potenziale (VECP) häufig normal sind (Beales et al. 1999). In einem Alter von 10 Jahren ist das ERG dann verändert bzw. erloschen, während im Durchschnitt mit 15,5 Jahren nach einer Untersuchung von Beales und Mitarbeitern alle BBS-Patienten erblindet sind (Runge et al. 1986, Beales et al. 1999). Das bedeutet, dass innerhalb eines Zeitraumes von zirka sieben Jahren ein Fortschreiten der Erkrankung von der Diagnosestellung bis zur Erblindung stattfindet. Die acht Patienten dieser Studie, bei denen die Erkrankung bereits zur Erblindung geführt hatte, waren durchschnittlich in einem Alter von 10 Jahren erblindet. Die Erstdiagnose Retinitis pigmentosa wurde bei den 27 Patienten (27/30) mit dieser Erkrankung im Durchschnitt mit neun Jahren gestellt. Es ist anzunehmen, dass in den meisten Fällen eine Retinitis pigmentosa erst diagnostiziert wurde, als das Elektretinogramm bereits einen hoch pathologischen Befund ergab und ein ausgeprägter Visusverlust vorlag. Vor allem Augenärzte sollten mit dem Krankheitsbild des BBS vertraut sein, um möglichst früh die Diagnose im Rahmen des BBS stellen zu können. Durch eine frühzeitige Diagnose könnte der Verlauf der Erkrankung bis zur Erblindung zwar nicht aufgehalten

werden, jedoch die Kinder rechtzeitig durch eine adäquate Frühförderung im Umgang mit dem fortschreitenden Visusverlust unterstützt werden.

Adipositas

Beim BBS wird überwiegend von einer Stammadipositas berichtet. Fettpolster treten verstärkt an Bauch, Hüften, Brust, sowie an Oberarmen und Oberschenkeln auf. Die Adipositas ist bei nahezu allen BBS-Patienten in sehr unterschiedlicher Ausprägung vorhanden. Bei 27 von 30 Patienten (90%) dieser Studie konnte eine Form des Übergewichts bis zur Adipositas Grad 3 festgestellt werden. Von den weiblichen Patienten waren 9/10 (90%) der Frauen betroffen und 18/20 (90%) der männlichen BBS-Patienten waren übergewichtig oder adipös. Drei der 30 Patienten (10%) waren normalgewichtig, darunter eine weibliche (1/10) und zwei männliche BBS-Patienten (2/20). Alle drei konnten nur durch strenge Diät ihr Gewicht halten.

Vergleicht man das Auftreten der Adipositas bei BBS-Patienten < 18 ($n=9/15$) und > 18 Jahren ($n=10/15$), so fällt die nahezu gleiche Verteilung des Symptoms unter den beiden Altersgruppen auf (Tab.14 und 15). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen somit, dass bereits im Kinder- und Jugendalter eine überproportionale Gewichtszunahme festgestellt werden kann und bei den kinderärztlichen Untersuchungen verstärkt darauf geachtet werden sollte. Die Familien der Betroffenen können z.B. durch die Vermittlung einer Diätberatung im Umgang mit der Erkrankung unterstützt werden.

Mentale Fähigkeiten

Ein Drittel der BBS-Patienten (10/30) dieser Studie bekam professionelle Unterstützung bei der schulischen Ausbildung in Form von Förderunterricht auf Sonderschulen für Lern-, Geistig- und Körperbehinderte oder in Förderklassen auf einer Regelschule. Das Ausmaß der Lernbehinderung erstreckte sich von leicht bis moderat. Nur eine Minderheit (4/30) war bisher nicht in der Lage gewesen, einen Schulabschluss zu erlangen. Sechs Patienten (6/30) hatten zum Erhebungszeitpunkt bereits einen Hauptschulabschluss erreicht, drei (3/30) einen Realschulabschluss und einer (1/30) das Fachabitur absolviert. Die übrigen sechzehn Patienten (16/30) befanden sich noch in der Schulausbildung. Zu den Berufen der Patienten, die bereits die Schullaufbahn beendet hatten, gehörten Telefonist, Masseur, Bademeister, Bürokaufmann oder Industriekaufmann. Vier Patienten arbeiteten in einer Behindertenwerkstatt. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung anderer Studien, dass die Mehrheit der BBS-Patienten signifikante Lernschwierigkeiten aufweisen, jedoch nur bei einer Minderheit eine hochgradige Beeinträchtigung der kognitiven Leistungen vorliegt (Green et al. 1989, Beales et al. 1999, Barnett et al. 2002, Moore et al. 2005).

Hypogonadismus bei Männern

Während in der Literatur von hypogonadotrophem Hypogonadismus bei Männern mit BBS berichtet wird, scheinen bei den weiblichen Patienten komplexere genitale Fehlbildungen im Vordergrund zu stehen (Bell et al. 1958, Klein und Ammann 1969). Durch die anatomische Lage der Genitalien beim Mann ist die Diagnostik bezüglich des Vorkommens eines Hypogonadismus beim BBS im Vergleich zur Frau deutlich einfacher. Aus diesem Grund könnten die unterschiedlichen Prävalenzen genitaler Veränderungen bei Männern (n=16/20) und Frauen (n=2/10) mit BBS untersuchungsbedingt sein. Es wurden mehrere Fälle publiziert, in denen weibliche BBS-Patientinnen gesunde Nachkommen zur Welt gebracht haben. Hingegen wurde in der Literatur nur über zwei Männer berichtet, die in der Lage waren Nachkommen zu zeugen (Bell et al. 1958, Klein und Ammann 1969, Green et al. 1989, O'Dea et al. 1996, Beales et al. 1999). In dem vorhandenen Patientenkollektiv hatte bisher keiner der Patienten Nachkommen gezeugt.

Nierenveränderungen und Veränderungen des Urogenitalsystems

Wie in einer Untersuchung von Hurley und Mitarbeitern gezeigt, sind die Nierenveränderungen die häufigste Todesursache beim BBS (Hurley et al. 1975). In dieser Studie wurden bei 30% der Patienten Veränderungen an den Nieren bzw. des Urogenitalsystems diagnostiziert. Diese im Vergleich zu anderen Untersuchungen (Tab.21) geringe Zahl muss im Zusammenhang mit dem niedrigen Durchschnittsalter von 21 Jahren dieses Patientenkollektivs betrachtet werden, da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der ersten klinischen Symptome mit dem Alter steigt. Da die Erfassung der klinischen Symptome in dieser Studie überwiegend auf der Auswertung der Fragebögen und nicht auf der persönlichen Vorstellung aller Patienten im Zentrum für Humangenetik in Marburg basierte, konnten nur die bereits diagnostizierten pathologischen Veränderungen des Urogenitalsystems bei der Auswertung mitberücksichtigt werden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den 30 BBS-Patienten dieser Studie weitere pathologische Veränderungen im Urogenitaltrakt vorlagen, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt waren.

Es lässt sich ein Zusammenhang zwischen den Nierenerkrankungen und dem Auftreten zusätzlicher Symptome des BBS wie Adipositas, arteriellem Hypertonus und Diabetes mellitus vermuten. Renale Erkrankungen machen ca. 5% aller Hypertonieursachen aus, während die Adipositas und der Diabetes mellitus sich sowohl ungünstig auf das kardiovaskuläre System als auch die Nieren auswirken. Eine Untersuchung des Blutdrucks und der Retentionswerte sollte in regelmäßigen Abständen vom Hausarzt durchgeführt werden.

5.1.4 Konsanguinität in der Studie

Ein gehäuftes Vorkommen des Bardet-Biedl-Syndroms mit 1:13.500 findet man unter den beduinischen Völkern Kuwaits, bei denen häufig Konsanguinität besteht (Farag und Teebi 1989). In Studien mit BBS-Patienten aus Kuwait konnte eine Rate an Blutsverwandten von 87% bei der untersuchten Patientengruppe im Vergleich zur Konsanguinitätsrate von 54% in der Gesamtpopulation ermittelt werden (Farag und Teebi 1988, Al-Awadi et al. 1985).

Von den 30 Patienten der Fragebogenstudie stammten zwei Patienten (2/30) aus türkischen Familien, ein Patient (1/30) kam aus einer libanesischen Familie und die anderen (27/30) waren gebürtige Deutsche. Einer der beiden türkischen Patienten und der aus dem Libanon stammende Patient kamen aus blutsverwandten Familien. Die Ergebnisse der Fragebogenstudie ergeben somit eine Blutverwandtschaft bei zwei von 30 Patienten und damit eine Konsanguinitätsrate von 7%.

Betrachtet man die gesamten 51 BBS-Patienten aus dem molekulargenetischen Teil dieser Studie, dann stammten 39 Patienten aus Deutschland, 10 Patienten waren türkischer Abstammung und jeweils ein Patient kam aus dem Libanon und aus Kanada (Tabelle 11). Bei einer der deutschen (1/39) BBS-Patienten konnte eine Verwandtschaft innerhalb der Familien sicher nachgewiesen werden. Sechs der zehn türkischen Familien und die Familie des libanesischen Patienten waren blutsverwandt. Die verwandten Eltern sind vorwiegend Vettern 1. und 2. Grades. Die Rate der Blutsverwandten beträgt in diesem Fall 16% und ist im Vergleich mit den Ergebnissen der BBS-Patienten aus Kuwait immer noch sehr gering.

5.2 Labormethoden

Es existieren unterschiedliche Methoden um nach Sequenzvarianten in Genen zu suchen. Für ein schnelles und effektives Mutationsscreening einer großen Patientengruppe kommen drei Methoden infrage: Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), Heteroduplexanalyse (HA) und Einzelstrangkonnformationsanalyse [single-strand conformational analysis (SSCA)]. Sie alle basieren auf der Amplifikation von DNA und einem abweichenden Laufverhalten der DNA-Fragmente in der Elektrophorese aufgrund von Sequenzveränderungen im Vergleich von Kontrolle und Patient. Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die Prinzipien dieser drei Methoden zum Mutationsscreening sowie die Vor- und Nachteile.

Tab. 23: Methoden zum Screening auf Sequenzvarianten

	SSCA (single-strand conformational analysis)	DGGE (denaturierende Gradientengelelektrophorese)	HA (Heteroduplexanalyse)
optimale Fragmentgröße	150-300 bp	bis 600 bp	bis 300 bp
Sensitivität	80-90%	95%	70-80%
Vorteil	kosteneffizient keine hohen technischen und methodischen Anforderungen	kosteneffizient hochsensitiv Mutationsanalyse großer Sequenzabschnitte	keine hohen technischen und methodischen Anforderungen mit SSCA kombinierbar
Nachteil	Sensitivität begrenzt - von PCR-Produktgröße abhängig keine Aussage über Lokalisation der Sequenzvariante möglich	bei GC-reichen Abschnitten schlechte Analyseergebnisse Etablierung aufwändig	geringe Sensitivität
Prinzip	Wanderungsgeschwindigkeit eines kleinen, einzelsträngigen DNA-Moleküls in einem nicht-denaturierenden Gel ist unter bestimmten Bedingungen sequenzabhängig	Änderung der Mobilität eines doppelsträngigen DNA-Moleküls beim Aufschmelzen	Aufgrund der unterschiedlichen Basensequenz der Mismatched-Region doppelsträngiger DNAs zeigen die DNAs sterische Konformationsunterschiede mit verschiedenem Laufverhalten im Gel

Nach einem zuvor erfolgten Mutationsscreening mit einer der o.g. Methoden sollte im Falle eines abnormalen DNA-Fragmentes der endgültige Nachweis einer Mutation mit der DNA-Sequenzanalyse erfolgen. Die DNA-Sequenzierung kann zum einen zur Erkennung noch unbekannter Gensequenzen angewandt werden, zum anderen lassen sich Mutationen in bereits bekannten Genen nachweisen. Für jede dieser Sequenzvariationen muss jedoch eine separate Sequenzreaktion angesetzt werden, was das Verfahren für die Bestimmung vieler verschiedener Mutationen und Polymorphismen sehr teuer und aufwändig macht. Aus diesen Gründen ist der generelle Einsatz dieser Methode zum Mutationsscreening nicht sinnvoll.

Einen neuen Ansatz zum Nachweis bekannter und unbekannter Mutationen ermöglicht die DNA-Chip-Technologie. Dabei trägt ein Chip die in Oligonucleotide aufgeteilte Sequenz eines oder mehrerer Gene. Eine einzige Hybridisierung der genomischen DNA einer Person gegen den Chip ermittelt, welche Polymorphismen und Mutationen die Person trägt. Auf diese Weise sind schnelle und kostengünstige Screens in großem Stil möglich. Diese Technologie wird in der Zukunft wahrscheinlich die Mutationssuchmethode der Wahl sein.

5.2.1 Die SSCA als Screeningmethode für DNA-Sequenzvarianten im Vergleich mit der direkten DNA-Sequenzanalyse

Die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) ist eine kostengünstige Methode für das Screening auf DNA-Sequenzvarianten. Insgesamt wird von einer Detektionswahrscheinlichkeit von 60 bis 80% ausgegangen (Kozlowski und Krzyzosiak 2005). Der Austausch einer Base reicht unter geeigneten Bedingungen dazu aus, dass es zu einer Konformationsänderung des DNA-Stranges kommt. Jedoch verursacht ein einfacher Basenaustausch nur dann eine Veränderung der Sekundärstruktur der Nukleinsäuresequenz, wenn er an Stellen lokalisiert ist, die für die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur unter den jeweiligen Bedingungen ausschlaggebend sind. Bei einem Screening mittels SSCA könnte so auch eine Probe mit einer Sequenzvariante übersehen werden, da sich das Laufverhalten im PAA-Gel nicht von dem des Wildtyps unterscheidet. Die Sekundärstruktur von Nukleinsäuresequenzen in der Acrylamid-Gelelektrophorese und somit das zu erwartende Laufverhalten lässt sich nicht zuverlässig voraussagen (Ziemssen et al. 2001). Die Detektionswahrscheinlichkeit von Mutationen mit der SSCA hängt hierbei vor allem von der Länge der PCR-Fragmente ab. Nach Auswertung verschiedener Untersuchungen kommen Hayashi und Yandell zu dem Ergebnis, dass bei einer Fragmentlänge < 200 Basenpaaren mit einer Sensitivität von $> 90\%$ zu rechnen ist und diese bei Fragmentlängen von 300-350 Basenpaaren noch bei über 80% liegt (Hayashi und Yandell 1993). Ein Nachteil der SSCA ist das Risiko bei Anwendung dieser Methode große Deletionen und Duplikationen zu übersehen.

Die Ausbildung der Sekundärstruktur ist jedoch nicht nur abhängig von der Basenfolge der DNA und der Länge des Produktes, sondern auch von der Position der Sequenzvariante, den Elektrophoresebedingungen, der Acrylamidkonzentration des Gels, dem Bisacrylamid/Acrylamid-Verhältnis, dem Hinzufügen oder Weglassen von Glycerol, der angelegten Spannung, der Laufzeit, der Konzentration des Ladepuffers und der Umgebungstemperatur. Es wurden zu Beginn dieser Studie in Probeläufen für jedes Primerpaar die optimalen SSCA-Bedingungen (Temperatur, Acrylamidkonzentration des Gels, Spannung und Laufzeit der Gele) ausgetestet.

Mit der Methode der SSCA können keine Angaben über die Art oder die Position einer Sequenzvariante innerhalb des durch Primer vorgegebenen Abschnitts gemacht werden. Daher muss zur vollständigen Identifizierung und Lokalisation einer Sequenzvariante eine Sequenzierung des betreffenden DNA-Bereichs erfolgen.

Die DNA-Sequenzierung ist die exakteste Methode zur Suche nach Sequenzvarianten, da hier die Basenfolge direkt bestimmt wird. Durch die Verfügbarkeit immer leistungsfähigerer Sequenzierautomaten ist die Sequenzierung zudem einfacher und schneller geworden. Trotzdem ist diese Methode vergleichsweise aufwändig und kostenintensiv, sodass von der direkten DNA-Sequenzierung zum Screening in dieser Studie abgesehen wurde. Durch das Vor-Screening mit Hilfe der SSCA konnten die Kosten erheblich geringer gehalten werden als sie durch die direkte DNA-Sequenzanalyse aller 51 DNA-Proben gewesen wären, allerdings mit dem Nachteil, dass eventuell nicht alle Mutationen mit der SSCA gefunden wurden. Dies gilt insbesondere für große Deletionen und Duplikationen. Vorteile der SSCA sind die kurze Einarbeitungszeit in die Methode, die rasche Durchführung und Auswertung der Analyse.

5.2.2 Methodisches Vorgehen in dieser Studie

Für diese Studie wurden aus den insgesamt 17 Exons des *BBSI*-Gens acht Exons (Exon 4, 5, 8, 10, 12, 13, 15 und 16) ausgewählt, in denen in der Literatur am häufigsten Mutationen beschrieben wurden (Mykytyn et al. 2002, 2003; Beales et al. 2003). Das Exon 4 wurde aufgrund der Größe geteilt und mit zwei unterschiedlichen Primern (4a und 4b) gescreent. In Exon 12 wurde die Suche nach Sequenzvarianten mit zwei Primerpaaren (19F/388R und 89F/388R) durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf insgesamt 70 PAA-Gele aufgetragen. Zeigten die DNA-Proben der Patienten Auffälligkeiten im Laufmuster wurden in einem zweiten Schritt die DNA-Proben der Familienmitglieder mitanalysiert und schließlich eine Sequenzanalyse des jeweiligen PCR-Produktes durchgeführt. Auf diese Weise wurde versucht, möglichst kostengünstig und effektiv Sequenzvarianten im *BBSI*-Gen bei den 51 Patienten, deren Eltern und Geschwistern zu finden.

Die SSCA-Gele in dieser Studie wurden bei allen DNA-Proben bei 10°C und 20°C Pufferkammertemperatur analysiert. Es wurde für das jeweilige Primerpaar die Temperatur etabliert, bei der das Bandenmuster am deutlichsten zu erkennen war. Zusätzlich wäre es möglich gewesen, durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von PAA-Gelen die Sensitivität der Methode zu verbessern. Dennoch wurden in dieser Arbeit mit den verwendeten 12% PAA-Gelen so gute Erfahrungen gemacht, dass diese Gelkonzentration für alle Gele beibehalten wurde. Die Polyacrylamidgele wurden, um die Objektivität zu gewährleisten, immer von zwei Personen ausgewertet. Bei Unstimmigkeiten wurden die jeweiligen Proben erneut untersucht.

Beim Screening im *BBSI*-Gen mit Hilfe der SSCA war es ein Ziel, die in der Literatur häufig beschriebene Mutation c.1169T→G (p.M390R) in Exon 12 sicher mit der SSCA darstellen zu können. Nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Primerpaaren konnten mit der Primerkombination 19F/388R zwar sechs Patienten mit gleich auffälligem Fragmentmuster im PAA-Gel in Exon 12 des *BBSI*-Gens dargestellt werden, eine Unterscheidung zwischen heterozygotem und homozygotem Träger der Mutation anhand des Gellaufs gelang aber nicht. Somit eignet sich die SSCA zum Nachweis der Punktmutation p.M390R und Unterscheidung von homozygotem und heterozygotem Mutationsträger nicht.

Zum sicheren Nachweis dieser Mutation wurde ein Restriktionsverdau mit *AvaII* etabliert (Abb. 5). Mit dieser Methode konnten durch die unterschiedliche Anzahl an Spaltprodukten im Vergleich zur Kontrollperson alle Träger der Mutation von Trägern der Wildtypallele unterschieden werden.

5.3 Sequenzvarianten bei 51 Patienten im *BBS1*-Gen

Es wurden bisher 12 BBS-Gene identifiziert, die in unterschiedlicher Häufigkeit mit dem Auftreten des Bardet-Biedl-Syndroms assoziiert sind. Stoetzel und Mitarbeiter konnten mit der Identifizierung des *BBS10*-Gens einen weiteren Genlocus entdecken, der ähnlich wie das *BBS1*-Gen, für ca. 20% der bisher gefundenen Mutationen beim BBS in Familien europäischen Ursprungs verantwortlich ist (Stoetzel et al. 2007). Die Häufigkeit der gefundenen Mutationen in den Genen *BBS2-9* und *BBS12* beträgt $\leq 5\%$, während bislang nur eine Familie mit einer Mutation im *BBS11*-Gen beschrieben wurde. Somit konnten bei allen bisher untersuchten BBS-Patienten ca. 70% der gefunden Mutationen in einem der 12 BBS-Gene entdeckt werden (Stoetzel et al. 2007). Es ist anzunehmen, dass bei den übrigen 30% der BBS-Familien bisher noch unbekannte BBS-Gene verantwortlich sind. Tabelle 24 gibt einen Überblick über die prozentuale Verteilung der in den verschiedenen BBS-Genen gefundenen Mutationen.

Tab. 24 : Häufigkeit von Mutationen in den 12 BBS-Genen

Name des Gens	Häufigkeit der Mutationen (%)	Literatur
<i>BBS1</i>	~ 23,2%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS2</i>	~ 8,1%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS3</i>	~ 0,4%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS4</i>	< 3%	Mykytyn et al. 2001
<i>BBS5</i>	~ 0,4%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS6</i>	~ 5,8%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS7</i>	~ 5%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS8</i>	~ 1,2%	Katsanis et al. 2004
<i>BBS9</i>	< 2%	Nishimura et al. 2005
<i>BBS10</i>	~ 20%	Stoetzel et al. 2006
<i>BBS11</i>	< 0,4%	Chiang et al. 2006
<i>BBS12</i>	~ 5%	Stoetzel et al. 2007

In dieser Studie wurden die DNA-Proben von 51 BBS-Patienten und 50 DNA-Proben von Kontrollpersonen auf Sequenzvarianten in acht Exons des *BBS1*-Gens mit Hilfe der SSCA untersucht. Bei keinem der 50 Kontrollpersonen wurde ein auffälliges Fragmentmuster im PAA-Gel und damit der Hinweis auf das Vorliegen einer Sequenzvariante gesehen. Bei 41 von 51 (80%) der Patienten konnten keine Sequenzvarianten im *BBS1*-Gen gefunden werden. Durch das Screening weiterer BBS-Gene mit der vorhandenen (n=51) und im Verlauf auf 76 BBS-Patienten vergrößerten Patientengruppe konnten weitere Mutationen im *BBS1*-, *BBS6*- und *BBS10*-Gen gefunden werden (Dissertation Frick 2007, Dissertation Claus 2008). Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass mit der Methode der SSCA Mutationen wie z.B. große Deletion oder Duplikationen in den untersuchten Exons dieser Studie übersehen wurden. Es wurden außerdem nur acht der insgesamt 17 Exons des *BBS1*-Gens untersucht. Da bisher 12 BBS-Gene bekannt sind und eventuell weitere, bisher nicht identifizierte Genloci existieren, war es zu erwarten, dass sich nur für einen Teil der analysierten Patientengruppe Sequenzvarianten im *BBS1*-Gen finden lassen würden.

Insgesamt konnten bei zehn BBS-Patienten dieser Studie eine oder mehrere Sequenzvarianten in einem der acht untersuchten Exons des *BBS1*-Gens gefunden werden (Tabelle 20). Es wurden acht verschiedene Sequenzvarianten im *BBS1*-Gen diagnostiziert.

Bei den Sequenzvarianten p.L126L in Exon 4 und IVS5+31_32insC in Intron 5 handelt es sich jeweils um einen Polymorphismus. Die Sequenzvariante p.L126L wurde von der Arbeitsgruppe Karmous-Benailly bereits als Polymorphismus beschrieben (Karmous-Benailly et al. 2005). Bei dem neu entdeckten Polymorphismus IVS5+31_32insC in Intron 5 kommt es zu einer Insertion eines Cytosins (C) in einer C-Abfolge. Dies scheint aufgrund der Lage im Intron keine Bedeutung bei der Krankheitsauslösung zu haben.

Durch das Screening im *BBS1*-Gen konnten drei bisher in der Literatur nicht beschriebene Punktmutationen (p.S80G und p.T91P beide in Exon 4 sowie p.A447T in Exon 13) entdeckt werden. Diese Mutationen wie auch die bekannte p.M390R-Mutation in Exon 12 bewirken einen Aminosäureaustausch in dem von *BBS1* codierten Protein und führen dadurch zu einer sinnverändernden Mutation (missense-Mutation). Ein Zusammenhang mit dem Auftreten des Phänotyps ist für diese Mutationen anzunehmen. Die von Mykytyn und Mitarbeitern identifizierte Deletion von 5 bp in Exon 12 (C377_F378delfsX412) und die von Beales und seinen Mitarbeitern entdeckte nonsense-Mutation in Exon 13 (p.R440X) sind zwei weitere in dieser Studie diagnostizierte Sequenzvarianten mit pathologischem Wert (Mykytyn et al. 2003, Beales et al. 2003).

Die p.M390R-Mutation in Exon 12 des *BBS1*-Gens ist die mit 18-32% am häufigsten auftretende Mutation beim BBS (Beales et. al. 2003). Da mit der Methode der SSCA der sichere Nachweis dieser Mutation in der untersuchten Patientengruppe (n=51) nicht gelang, wurde für die Diagnostik der Punktmutation p.M390R ein Restriktionsverdau mit *AvaII* etabliert. Mit dieser Methode konnten alle 51 klinisch diagnostizierten BBS-Patienten und 50 Kontrollpersonen genotypisiert werden. Keiner der Kontrollpersonen war Träger dieser Mutation. Bei den BBS-Patienten konnten 88% (45/51) als Träger des homozygoten Wildtyps (390MM), 4% (2/51) als heterozygote Träger der Mutation (390MR) und 8% (4/51) als homozygote Träger der Mutation (390RR) diagnostiziert werden (Tabelle 18). Die Allelfrequenz für das mutante Allel liegt bei 10% und entspricht den Ergebnissen von Beales und Mitarbeitern, die in ihrer untersuchten Patientengruppe eine Allelfrequenz von 14% beschrieben (Beales et al. 2003). Bei keinem der Träger der p.M390R-Mutation konnte eine weitere Sequenzvariante im *BBS1*-Gen diagnostiziert werden. Nach Daten aus der Literatur wurde diese Mutation vorwiegend bei BBS-Patienten der kaukasischen Bevölkerung festgestellt, während für die vom BBS häufig betroffenen Beduinenvölker andere BBS-Gene verantwortlich zu sein scheinen (Beales et al. 2003, Katsanis et al. 2004).

In der untersuchten Patientengruppe (n=51), die sich vorwiegend aus deutschen BBS-Patienten (n=39) zusammensetzt, konnte bei keinem der türkischen (n=10) oder libanesischen Patienten (n=1) die p.M390R-Mutation in Exon 12 oder eine andere Mutation in einem der analysierten Exons des *BBS1*-Gens gefunden werden. Es ist anzunehmen, dass bei den Patienten dieser Bevölkerungsgruppen andere BBS-Gene als *BBS1* für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich sind oder dass sich Mutationen in den ausstehenden Exons des *BBS1*-Gens bei diesen Patienten finden.

Die beiden Punktmutationen p.S80G und p.T91P in Exon 4 (Abb. 17 und 18) wurden jeweils heterozygot bei Patientin 2087 diagnostiziert. Patientin 2087 ist als einzige der Familie Trägerin der beiden heterozygoten und vermutlich pathogenen Mutationen in einem Exon des *BBS1*-Gens. In Kapitel 4.3.4 wurde bereits erörtert, dass bisher nicht geklärt ist, ob diese beiden Sequenzvarianten auf einem oder auf zwei Allelen (cis- bzw. trans-Stellung) des Exon 4 lokalisiert sind. Patientin 2087 und vier weitere in Tabelle 25 aufgeführte BBS-Patienten sind die einzigen am BBS Erkrankten ihrer jeweiligen Familien. Bei ihnen muss aufgrund des Nachweises einer oder mehrerer heterozygoter Sequenzvarianten in *BBS1* das Vorliegen mindestens einer weiteren heterozygoten Mutation entweder in einem der nicht untersuchten Exons des *BBS1*-Gens oder einem der anderen 11 bekannten oder einem bisher nicht identifizierten BBS-Gen angenommen werden. Bei Patientin 2087 konnten bei der Analyse in *BBS6* weitere Sequenzvarianten entdeckt werden (Kapitel 5.5).

Tabelle 25: BBS-Patienten mit heterozygoter Sequenzvariante in *BBS1*

DNA-Nr.	Exon	heterozygote Sequenzvariante(n) in <i>BBS1</i>
2087	4	(p.S80G, p.T91, p.L126L) in Exon 4
2105	5	IVS5+31_32insC
2144	12	p.M390R
2160	12	p.M390R
2089	13	p.R440X

Die Punktmutation p.A447T (Abb. 25) sowie die Deletionsmutation von 5 bp (C377_F378delsX412)(Abb. 23), die zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch zur fehlerhaften Translation mit Proteinverkürzung führt, konnten heterozygot bei Patient 2095 nachgewiesen werden. Patient 2095 ist somit compound-heterozygoter Mutationsträger in *BBS1*. Für beide Mutationen ist ein Zusammenhang mit der Auslösung der Erkrankung anzunehmen. Kein weiterer Familienangehöriger ist am BBS erkrankt oder Träger beider Mutationen.

5.3.1 Analyse der Patienten dieser Studie auf Sequenzvarianten im *BBS10*-Gen

Stoetzel und Mitarbeiter konnten eine Mutation im *BBS10*-Gens identifizieren, die für ca. 10% aller Mutationen beim BBS verantwortlich ist (Stoetzel et al. 2006). Es handelt sich um die Frameshift-Mutation C91fsX95 (c.270_271insT) in Exon 2 des *BBS10*-Gens. Nach Abschluss der vorliegenden Studie erfolgte mit der vergrößerten Patientengruppe sowohl ein Screening auf das Vorliegen der p.M390R-Mutation in *BBS1* (n=77, davon 56 Deutsche, 12 Türken und 9 Personen anderer Bevölkerungsgruppen) als auch das Screening auf die C91fsX95-Mutation in *BBS10* (n=78, davon 56 Deutsche, 13 Türken und 9 Personen anderer Bevölkerungsgruppen) (Claus et al. 2007). Insgesamt konnte bei 43% (24/56) der deutschen BBS-Patienten eine dieser beiden Mutationen entdeckt werden. Während die p.M390R-Mutation bei 14% (8/56) der Patienten gefunden wurde, trat die Frameshift-Mutation C91fsX95 mit 29% (16/56) mehr als doppelt so häufig bei den deutschen BBS-Patienten der untersuchten Patientengruppe auf. Es bleibt abzuwarten, ob beim Screening dieser Patientengruppe in den anderen BBS-Genen weitere Mutationen gefunden werden. Dies ist vor allem bei den Patienten mit nur einer heterozygoten Mutation in einem Gen (Tab.25) zu erwarten.

5.4 Molekulargenetische Ergebnisse der 30 Patienten der Fragebogenstudie

Bei acht der 30 BBS-Patienten, die an der Fragebogenstudie teilnahmen, konnte mindestens eine Sequenzvariante im *BBS1*-Gen gefunden werden. Patient 2125, auf den sich die Kasuistik dieser Studie bezieht, ist Träger von zwei homozygoten Sequenzvarianten, p.Y37C und p.G532V (Abb. 9), im *BBS6*-Gen (Dissertation Frick 2007). Bei der Sequenzvariante p.G532V handelt es sich um einen Polymorphismus (Andersen et al. 2005). Patient 2125 zählt zu den fünf BBS-Patienten der Fragebogenstudie, bei denen zum Zeitpunkt der Auswertung alle sechs Hauptsymptome des BBS aufgetreten waren. Wie in der Kasuistik dargestellt, ist Patient 2125 von der Erkrankung stark betroffen. Zusätzlich zu den sechs Hauptsymptomen des BBS konnten bei ihm weitere sieben Nebensymptome (Tab. 12) erfasst werden. Eine Erklärung für die große Anzahl an Haupt- und Nebensymptomen bei Patient 2125 könnte das mit 32 Jahren fortgeschrittene Alter im Vergleich zum Durchschnittsalter von 21 Jahren (Tab. 13) der gesamten Patientengruppe (n=30) sein. Beim Bardet-Biedl-Syndrom sind einige Symptome oder die daraus resultierenden Spätfolgen erst mit zunehmendem Alter zu erwarten.

Bei keinem der fünf Patienten mit sechs Hauptsymptomen konnte eine Sequenzvariante in den acht untersuchten Exons des *BBS1*-Gens nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass sich, wie am Beispiel von Patient 2125 gezeigt, beim Mutationsscreening anderer BBS-Gene oder der noch ausstehenden Exons des *BBS1*-Gens Sequenzvarianten bei diesen Patienten finden lassen.

Bei den acht BBS-Patienten mit mindestens einer Sequenzvariante im *BBS1*-Gen (Tab. 17) konnte bei sieben der acht Patienten das von Beales und Mitarbeitern geforderte Auftreten von mindestens drei Haupt- und zwei Nebensymptomen zur Diagnose des BBS festgestellt werden (Beales et al. 1999). Nur Patientin 2084, die Schwester von Patient 2060, die als homozygote Trägerin der p.M390R-Mutation im *BBS1*-Gen identifiziert wurde, weist zum Zeitpunkt dieser Studie nur zwei Hauptsymptome des BBS (Fehlbildung des weiblichen Genitale in Form einer Vaginalatresie und eine starke Entwicklungsverzögerung aufgrund einer mentalen Retardierung) auf. Der acht Jahre ältere Bruder mit der DNA-Nr. 2060 zeigt vier Haupt- und zwei Nebensymptome des BBS. Ein weiteres Kind dieser Familie mit der DNA-Nr. 2083 ist wie die Eltern 2081 und 2082 nicht vom BBS betroffen (Tab. 18, Abb. 15). Da Patientin 2084 zum Zeitpunkt dieser Studie erst acht Jahre alt ist und die Eltern über eine erhebliche geistige Behinderung der Tochter berichten, besteht die Möglichkeit, dass weitere Symptome des BBS wie z.B. Retinitis pigmentosa oder Adipositas sich erst mit zunehmendem Alter entwickeln.

Die in Tabelle 18 aufgeführte Familie 2053 mit zwei vom BBS betroffenen Kindern (2168 und 2169) fehlt bei der Auswertung der Fragebogenstudie (Tab. 17). Die Fragebögen der beiden Schwestern 2168 und 2169 wurden erst nach Fertigstellung der Auswertung zugesandt. Da alle BBS-Patienten außer Patientin 2169, die durch den Restriktionsverdau als Trägerin der p.M390R-Mutation genotypisiert wurden, auch an der Fragebogenstudie teilnahmen, wurden in Tabelle 18 die Ergebnisse der Fragebögen von Patientin 2169 und der Schwester 2168 nachträglich mit aufgeführt. Es fällt auf, dass Patientin 2169 im Gegensatz zu der jüngeren Schwester 2168 weniger stark vom BBS betroffen zu sein scheint. Patientin 2169 hat den Angaben aus dem Fragebogen zufolge zwei Haupt- und zwei Nebensymptome des Bardet-Biedl-Syndroms und liegt damit außerhalb der von Beales und Mitarbeitern geforderten Kriterien zur Diagnose des BBS (Beales et al. 1999). Die 13 Jahre alte Schwester mit der DNA-Nr. 2168 kann drei Hauptsymptome und mindestens sechs Nebensymptome des BBS angeben. Da in diesem Fall dem Alter (19 Jahre) wahrscheinlich nicht die entscheidende Rolle zukommt und Patientin 2169, ebenso wie die Schwester 2168, homozygote Trägerin der p.M390R-Mutation ist, könnte dies ein Beispiel für die unvollständige Penetranz dieses Phänotyps in Familie 2053 sein. Es wäre möglich, dass nur die Schwester 2168 eine weitere Mutation in einem anderen BBS-Gen trägt und diese die vollständige Ausprägung des Phänotyps verursacht, während die Schwester 2169 zwar Mutationsträgerin ist, ohne jedoch selber am BBS erkrankt zu sein.

Insgesamt muss festgehalten werden, dass die Ausprägung des BBS-Phänotyps sowohl unter den Trägern der Punktmutation p.M390R in Exon 12 (Tab. 18) als auch unter den vier Patienten mit Sequenzvarianten im *BBS1*-und/oder *BBS6*-Gen (Tab. 17) sehr unterschiedlich ist und eine Phänotyp-Genotyp-Assoziation nicht besteht. Ein Unterschied im Auftreten und der Ausprägung des Phänotyps zwischen homozygoten und heterozygoten Trägern einer *BBS1*-Mutation sowie BBS-Patienten ohne *BBS1*-Mutation konnte durch die Auswertung der 30 Fragebögen nicht festgestellt werden. Durch die Fragebogenstudie konnte das charakteristische Bild der Erkrankung mit sechs Hauptsymptomen und einer großen Anzahl an Nebensymptomen erfasst werden. Die Ausprägung und damit auch der Schweregrad der Erkrankung sind altersabhängig, aber auch inter- und intrafamiliär sehr unterschiedlich. Für allgemeine Aussagen sind die Fallzahlen dieser Studie allerdings zu klein.

5.5 Sequenzvarianten bei Familie 2033 und 2032

5.5.1 Familie 2033

Bei Patientin 2087 konnten zwei heterozygote Mutationen im *BBS1*-Gen (p.S80G und p.T91P) diagnostiziert werden. Es ist nicht geklärt, ob sich diese beiden Sequenzvarianten auf einem Allel oder auf zwei Allelen befinden (Kapitel 4.3.4). Da die Mutationen (p.S80G und p.T91P in Exon 4) allein bei Patientin 2087 diagnostiziert wurden, könnte es sich in beiden Fällen um eine Neumutation im Sinne eines Polymorphismus oder um Sequenzierartefakte handeln.

Bei einem späteren Screening im *BBS6*-Gen konnte bei Patientin 2087 zusätzlich eine heterozygote, vom Vater 2133 vererbte Punktmutation (p.Y37C in Exon 3) gefunden werden (Dissertation Frick 2007). Diese Mutation und die beiden Mutationen in *BBS1* sind als pathologisch und damit krankheitsverursachend einzustufen. Außer Patientin 2087 ist keiner der Familienangehörigen am BBS erkrankt. Nur Patientin 2087 ist Trägerin der beiden Mutationen im *BBS1*- und der Mutation im *BBS6*-Gen.

Zusätzlich zu den drei oben aufgeführten Sequenzvarianten im *BBS1*- und *BBS6*-Gen wurden bei Patientin 2087 insgesamt drei Polymorphismen entdeckt. Es handelt sich um die von der Mutter vererbte Sequenzvariante p.L126L in Exon 4 des *BBS1*-Gens und die Sequenzvarianten p.I178I in Exon 3 und p.G532V in Exon 6 des *BBS6*-Gens, die alle bereits in der Literatur als Polymorphismen beschrieben wurden (Karmous-Benailly et al. 2005, Andersen et al. 2005).

Eine Übersicht der sechs diagnostizierten Sequenzvarianten bei Familie 2033 im *BBS1*- und *BBS6*-Gen findet sich in Tabelle 26. Alle Familienangehörigen wurden auf die drei verschiedenen Sequenzvarianten in *BBS1* genotypisiert. Bei den drei Sequenzvarianten in *BBS6* erfolgte nur für die Punktmutation p.Y37C eine Genotypisierung der gesamten Familie. Daher liegen von den Familienangehörigen außer Patientin 2087 keine Ergebnisse einer Sequenzanalyse im *BBS6*-Gen vor. Die Anzahl der mutanten Allele in *BBS6* für die DNA-Nr. 2133, 2086 und 2085 muss daher in Klammern gesetzt werden.

Tab. 26: Ergebnisse des Mutationsscreening in *BBS1* und *BBS6* von Familie 2033

Gen	DNA-Nummer	Familienmitglied	BBS	Sequenzvarianten			Mutante Allele
<i>BBS1</i>				p.S80G	p.T91P	p. L126L	
	2133	Vater	–	wt	wt	wt	0
	2087	Patientin	+	hetero	hetero	hetero	2 / 3 ?
	2086	Mutter	–	wt	wt	hetero	1
	2085	Bruder	–	wt	wt	wt	0
<i>BBS6</i>				p.Y37C	p.G532V	p. I178I	
	2133	Vater	–	hetero	ng	ng	(1)
	2087	Patientin	+	hetero	homo	hetero	4
	2086	Mutter	–	wt	ng	ng	(0)
	2085	Bruder	–	hetero	ng	ng	(1)

homo = homozygot
hetero = heterozygot

wt = Wildtyp
ng = nicht genotypisiert

Tabelle 27 gibt einen Überblick über die klinischen Symptome von Patientin 2087, die sich trotz der Mutationen in zwei BBS-Genen (digen) nicht schwerer betroffen zeigt als beispielsweise Patienten mit der homozygoten p.M390R-Mutation in *BBS1* (monogen).

Tab. 27: Kasuistik der Patientin 2087

Patientin 2087	Sequenzvarianten	Klinische Auffälligkeiten
23 Jahre Diagnose BBS mit 8 J. Besuch der Sonderschule z. Zt. in Behindertenwerkstatt	<i>BBS1</i>-Gen: p.S80G + p.T91P (Ex 4) Polymorphismus p.L126L (Ex 4) <i>BBS6</i>-Gen: p.Y37C (Ex 3) Polymorphismus p.I178I (Ex 3) Polymorphismus p.G532V (Ex 6)	Hauptkriterien Retinitis pigmentosa mit 10 J. (Visus 5%) BMI = 32 kg/m ² Mentale Retardierung Lernschwierigkeiten Nebenkriterien Sprachverzögerung Hemeralopie Syndaktylie der 2. und 3. Zehe bds arterieller Hypertonus Entwicklungsverzögerung Hypodontie

5.5.2 Familie 2032

Ein Beispiel dieser Studie für Compound-Heterozygotie ist der Patient 2095. Als einziger der Familie 2032 ist er Träger von zwei heterozygoten Mutationen im *BBS1*-Gen. Es konnte sowohl die vom Vater 2101 vererbte Deletion von 5 bp, die zum Auftreten der Frameshift-Mutation c.1130_1134del (C377_F378delfsX412) in Exon 12 führt, als auch die von der Mutter 2100 vererbte Punktmutation c.1339G→A (p.A447T) in Exon 13 bei ihm nachgewiesen werden. Außer Patient 2095 hat keiner der Familienangehörigen klinische Merkmale des Bardet-Biedl-Syndroms. Sowohl die von Mykytyn und Mitarbeitern beschriebene Deletionsmutation von 5 bp in Exon 12 als auch die Punktmutation in Exon 13 sind als krankheitsverursachend einzuschätzen (Mykytyn et al. 2003). Erst die Kombination beider heterozygoter Mutationen scheint zum Auftreten der Erkrankung geführt zu haben. Sofern in den anderen BBS-Genen (*BBS2-12*) keine weiteren Mutationen bei Patient 2095 gefunden werden, ist dies ein Beispiel für den autosomal-rezessiven Erbgang beim BBS. Tabelle 28 gibt eine Übersicht der beiden Mutationen im *BBS1*-Gen bei Familie 2032.

Tab. 28: Familie 2032 und die beiden Mutationen im *BBS1*-Gen

Familien-nummer	DNA-Nummer	Familien-mitglied	BBS	C377_F378delfsX412 in Exon 12	p.A447T in Exon 13	Mutante Allele
2032						
	2101	Vater	–	heterozygot	wt	1
	2095	Patient	+	heterozygot	heterozygot	2
	2100	Mutter	–	wt	heterozygot	1
	2098	Bruder	–	heterozygot	wt	1
	2099	Bruder	–	wt	heterozygot	1

wt = Wildtyp

5.6 Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms und die Bedeutung für die humangenetische Beratung

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine autosomal-rezessiv vererbte und genetische heterogene Erkrankung, die sich aus einer Kombination von verschiedenen Symptomen mit unterschiedlicher Schwere und Häufigkeit zusammensetzt. Es konnten bisher 12 BBS-Gene lokalisiert und charakterisiert werden (*BBS1-BBS12*). Bei ca. 70% der bisher untersuchten BBS-Patienten konnten Mutationen in einem dieser 12 Gene entdeckt werden (Stoetzel et al. 2007). Bei den übrigen ca. 30% der BBS-Familien wird die Ursache für die Entstehung der Erkrankung in weiteren, bisher noch nicht identifizierten Genen vermutet. Neben Patienten mit Mutationen in nur einem der BBS-Gene (monogen) konnten bei anderen Patienten Mutationen in zwei BBS-Genen (digen) gefunden werden (Katsanis et al. 2001). Katsanis und Mitarbeiter beschrieben Familien, bei denen die am BBS erkrankten Personen eine homozygote oder eine compound-heterozygote Mutation in einem BBS-Gen (Hauptgen) aufwiesen mit einer weiteren heterozygoten Mutation in einem anderen BBS-Gen (Nebengen), während bei den gesunden Familienangehörigen Mutationen in nur einem BBS-Gen diagnostiziert wurden (Katsanis et al. 2001, 2004). Sie beschrieben mit diesem Beispiel den digenen Erbgang beim BBS. In weiteren Studien konnten vermehrt Familien mit einem digenen Erbgang beim BBS gefunden werden (Mykytyn et al. 2002, 2003). Es wurden sowohl Patienten mit insgesamt zwei homozygoten Mutationen (vier mutante Allele) in zwei BBS-Genen als auch Patienten mit zwei heterozygoten Mutation (zwei mutante Allele) in zwei BBS-Genen beschrieben (Beales et al. 2003, Katsanis et al. 2004). Beim heutigen Stand der Forschung erscheint nach Hinweisen aus der Literatur das Vorliegen eines oligogenen Erbganges am wahrscheinlichsten (Katsanis et al. 2004).

Ein Beispiel dieser Studie für den klassischen autosomal-rezessiven Erbgang beim BBS ist Familie 2025. Patient 2060 und die Schwester 2084, die beide am BBS erkrankt sind, konnten mit der Sequenzanalyse als homozygote Träger der p.M390R-Mutation im *BBS1*-Gen diagnostiziert werden. Die gesunden Eltern, 2081 und 2082, sowie der gesunde Bruder 2083 sind heterozygote Mutationsträger. Bei der genetischen Beratung besteht für die Eltern, 2081 und 2082, ein Risiko von 25% ein weiteres Kind mit BBS zu bekommen. Die Wahrscheinlichkeit des Bruders 2083 mit einer gesunden Partnerin ein Kind mit BBS zu zeugen liegt unter 1%. Eine Bestimmung des Genotyps bezüglich der p.M390R-Mutation wäre für asymptotische Partner sowohl des gesunden als auch der beiden am BBS erkrankten Kinder möglich.

Bei Familie 2032 konnte ebenfalls der autosomal-rezessive Erbgang nachgewiesen werden. Patient 2095 ist compound-heterozygoter Träger von zwei *BBS1*-Mutationen (C377_F378delfsX412 in Exon 12 und p.A447T in Exon 13). Die Mutation C377_F378delfsX412 wurde vom Vater 2101 an die Söhne 2095 und 2098 vererbt, während die Mutter 2100 die Punktmutation p.A447T an die Söhne 2095 und 2099 weitergegeben hat (Abb. 24). Außer Patient 2095 ist keiner der Familienangehörigen am BBS erkrankt und Träger beider Mutationen. Das Risiko für weitere Nachkommen der Eltern am BBS zu erkranken beträgt 25%. Die beiden Brüder 2098 und 2099, die beide heterozygote Mutationsträger für zwei unterschiedliche Mutationen im *BBS1*-Gen sind, haben mit asymptomatischen Partnerinnen ein sehr geringes Risiko für das Auftreten des BBS unter ihren Nachkommen. Asymptomatischen Partnerinnen von Patient 2095 und seinen beiden Brüdern kann eine Untersuchung auf das Vorliegen der beiden familiär diagnostizierten Sequenzvarianten in *BBS1* als auch auf die beiden Mutationen p.M390R (*BBS1*) und C91fsX95 (*BBS10*) angeboten werden.

Ein Beispiel dieser Studie für den digenen Erbgang beim BBS ist Familie 2033. Patientin 2087 ist Trägerin der beiden Punktmutationen p.S80G und p.T91P in *BBS1* sowie einer heterozygoten Mutation (p.Y37C in Exon 3) in *BBS6* (Dissertation Frick 2007). Bei den *BBS1*-Mutationen ist nicht erklärt, ob sich diese beiden Sequenzvarianten auf einem Allel oder auf zwei Allelen befinden. Beide Mutationen wurden nur bei Patientin 2087 und nicht bei den Eltern diagnostiziert. Da nicht geklärt werden konnte, ob es sich bei diesen Mutationen nur um Sequenzierartefakte oder um echte Neumutationen handelt oder eventuell ein Elternteil Träger eines Keimzellmosaiks ist, kann die Wahrscheinlichkeit für weitere Nachkommen dieser Eltern mit BBS nicht eingeschätzt werden. Die Verifizierung der Befunde in *BBS1* sollte anhand einer zweiten Blutprobenanalyse erfolgen und der Familie eine Vorstellung zur humangenetischen Beratung empfohlen werden.

Wichtige Aspekte der humangenetischen Beratung bei Familien mit BBS stellen die Vererbung und die damit verbundene Wahrscheinlichkeitsberechnung für weitere Nachkommen dar. Bisläng können Familien mit dem BBS routinemäßig auf die bekannte p.M390R-Mutation in *BBS1* und die mit 29% relativ häufig in der deutschen Population zu findende Frameshift-Mutation C91fsX95 (c.270_271insT) im *BBS10*-Gen untersucht werden (Claus et al. 2007). Nach den Ergebnissen einer Untersuchung an 56 BBS-Patienten der deutschen Bevölkerung konnten bei 43% (24/56) entweder die p.M390R-Mutation in *BBS1* oder die C91fsX95-Mutation in *BBS10* molekulargenetisch diagnostiziert werden. Unter Berücksichtigung der

ausländischen BBS-Patienten kann durch die Diagnostik auf diese beiden Mutation eine Detektionsrate von 32% (25/78) erreicht werden (Claus et al. 2007).

Die Beratung hinsichtlich des Erkrankungsrisikos für weitere Nachkommen der betroffenen Familien wird erschwert durch die große Anzahl der bisher bekannten BBS-Gene (*BBS1-12*) mit einem vermutlich oligogenen Erbgang. Da nur in wenigen BBS-Familien eine genetische Ursache für das Auftreten der Erkrankung gefunden wurde, wird das Vorhandensein weiterer BBS-Gene erwartet.

5.7 Ausblick

Zur Klärung der Vererbung des BBS sollten weitere Studien mit der vorhandenen Patientengruppe an den bisher noch nicht untersuchten BBS-Genen erfolgen. Erst nach Zusammenführung der Ergebnisse des Mutationsscreenings in verschiedenen BBS-Genen ist eine endgültige Beurteilung über das Krankheitsbild, die zugrunde liegenden Mutationen und eine Aussage über den Erbgang beim BBS zu erwarten. Da ca. 43% aller deutschen BBS-Patienten Träger der p.M390R-Mutation in *BBS1* oder der Frameshift-Mutation C91fsX95 in *BBS10* sind, sollte allen BBS-Familien, auch außerhalb dieser Studiengruppe, eine molekulargenetische Untersuchung auf das Vorliegen dieser Mutationen angeboten werden. Mit der Methode der DNA-Chiptechnologie besteht die Möglichkeit bei negativem Screeningergebnis bezüglich der Mutationen p.M390R und C91fsX95, die betroffenen Patienten auf Sequenzvarianten in den Genen *BBS1-12* zu analysieren. Die DNA-Chiptechnologie für die Gene *BBS1-12* wird zurzeit von einer Firma in Estland relativ kostengünstig angeboten. Aufgrund der im Vergleich zu anderen Erkrankungen geringen Inzidenz des BBS wäre eine Kooperation mit Studiengruppen im In- und Ausland zum Austausch und Vergleich der Ergebnisse sinnvoll. Es bleibt abzuwarten, in wieweit die Ergebnisse dieser Studie den betroffenen Familien im Umgang mit der Erkrankung helfen können. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die Forschung am Bardet-Biedl-Syndrom voranzubringen, damit nach der Erforschung der Grundlagen dieses Wissen den betroffenen Familien als auch den betreuenden Ärzten und dem Umfeld zu Gute kommen kann.

6. Zusammenfassung

Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine Multisystemerkrankung, deren Ursache in der Störung der Zilienfunktion und des intrazellulären Proteintransports entlang von Mikrotubulistrukturen zu finden ist. Die Kardinalsymptome sind postaxiale Polydaktylie, Retinitis pigmentosa, Adipositas, mentale Retardierung, Hypogonadismus beim Mann und Nierenfehlbildungen. In Bezug auf die Ausprägung des Phänotyps existiert eine große inter- und intrafamiliäre Variabilität. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen konnten bisher 12 BBS-Gene lokalisiert und charakterisiert werden (*BBS1-12*).

An dieser Studie nahmen insgesamt 51 BBS-Patienten (39 Deutsche, 10 Türken und zwei Patienten anderer Herkunft) teil. Zur Erfassung der Ausprägung des BBS-Phänotyps wurde allen teilnehmenden Familien ein Fragebogen über die klinischen Symptome des BBS zugeschickt. Von 30 dieser 51 Patienten (59%) (20 ♂ und 10 ♀) konnten die Fragebögen hinsichtlich der Verteilung der Hauptsymptome und im Vergleich mit internationalen Daten aus der Literatur ausgewertet werden. Trotz der kleinen Fallzahl waren die Ergebnisse dieser Studie vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Literatur. Wie durch andere Forschungsgruppen publiziert, sind die mit 80-90% am häufigsten auftretenden Hauptsymptome des BBS postaxiale Polydaktylie, Retinitis pigmentosa, Adipositas, mentale Retardierung und Hypogonadismus. Diese Ergebnisse konnten in dieser Studie trotz der kleinen Fallzahl bestätigt werden. Nierenfehlbildungen traten mit einer Häufigkeit von 30% im Vergleich zur Literatur eher selten auf.

Das *BBS1*-Gen zählt zu den am häufigsten involvierten Genen beim BBS. Ein Grund dafür ist die mit einer Allelfrequenz von 14% auftretende Punktmutation p.M390R in Exon 12 des *BBS1*-Gens. Alle 51 Patienten dieser Studie wurden mit der Methode der Restriktionsspaltung mit *AvaII* auf das Vorhandensein der p.M390R-Mutation analysiert. Es konnte eine Allelfrequenz von 10% ermittelt werden. Dies entspricht den internationalen Daten.

Da ca. 23% aller beim BBS bekannten Mutationen im *BBS1*-Gen gefunden wurden, erfolgte zusätzlich ein Mutationsscreening in acht der insgesamt 17 Exons des *BBS1*-Gens mit Hilfe der single-strand conformational analysis (SSCA). Zehn der 51 analysierten DNA-Proben (n=10) zeigten ein auffälliges Fragmentmuster bei der SSCA. Es erfolgte eine Sequenzanalyse dieser zehn DNA-Proben zusammen mit den Proben ihren Familienangehörigen. Insgesamt wurden acht verschiedene Sequenzvarianten [p.S80G (n=1), p.T91P (n=1), p.L126L (n=1), IVS5+31_32insC (n=1), p.M390R (n=6), C377_F378delfsX412 (n=1), p.A447T (n=1) und p.R440X (n=1)] bei 10 verschiedenen Patienten in *BBS1* gefunden.

Bei Patientin 2087 wurden drei und bei Patient 2095 zwei Sequenzvarianten nachgewiesen. Es konnten zwei Polymorphismen (p.L126L in Exon 4 und IVS5+31_32insC in Intron 5) in der untersuchten Patientengruppe (n=51) entdeckt werden. Außerdem wurden drei Punktmutationen (p.S80G, p.T91P und p.A447T) neu diagnostiziert. Die anderen drei gefundenen Mutationen p.M390R, p.R440X sowie die Frameshift-Mutation C377_F378delsX412 sind bereits in der Literatur publiziert worden.

Die Familien 2025 und 2032 sind Beispiele für den autosomal-rezessiven, monogenen Erbgang beim BBS. Während Patient 2060 (Familie 2025) homozygoter Mutationsträger von p.M390R ist, ist Patient 2095 (Familie 2032) als einziger der Familie compound-heterozygoter Träger von zwei verschiedenen Mutationen in *BBS1* (C377_F378delsX412 und p.A447T). Der autosomal-rezessive Erbgang konnte besonders häufig bei Familien mit der p.M390R-Mutation in *BBS1* beobachtet werden. Bei der Auswertung der Fragebogenstudie wurden auch vom BBS stark betroffene Patienten mit keiner nachweisbaren oder nur einer heterozygoten Mutation im *BBS1*-Gen gefunden. In diesen Fällen sind Mutationen in einem oder mehreren der *BBS*-Gene 2-12 und damit Abweichungen vom monogenen Erbgang beim BBS zu erwarten.

Ein ausschließlich autosomal-rezessiver Erbgang beim BBS erscheint nur bei einigen Familien zutreffend. Wie am Beispiel dieser Studie (Familie 2033) dargestellt scheint auch eine digene Vererbung beim BBS möglich. Patientin 2087 (Familie 2033) ist als einzige der Familie am BBS erkrankt und heterozygote Trägerin von drei pathologischen Mutationen in *BBS1* und *BBS6*. Für den Nachweis einer oligogenen Vererbung beim BBS sind die Untersuchungen weiterer BBS-Gene und der Vergleich mit den Daten dieser und anderer Studien zu diesem Thema notwendig. Das Mutationsscreening in verschiedenen BBS-Genen wäre durch die DNA-Chip-Technologie möglich. Eine Routineuntersuchung auf die beiden häufigsten Mutationen, p.M390R in *BBS1* und C91fsX95-Mutation in *BBS10*, kann den ratsuchenden Familien mit konventionellen Methoden angeboten werden.

7. Abkürzungen und Symbole

7.1 Abkürzungen





A	Adipositas
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
Acc.No.	Identifikationsnummer der Genbank
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ARL6	ADP-ribosylation-factor-like-6
AS	Aminosäure
<i>AvaII</i>	<i>Anabaena variabilis</i> II
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar(e)
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Wurm)
c.h.	compound-heterozygot
C12orf58	Chaperon des Typs II
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid
DM16/DUF1448	In 10 Species konservierte Repeat-Domäne mit regulatorischem X-Box Motiv.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Forward
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Heteroduplexanalyse
HG	Hypogonadismus
hetero	heterozygot
homo	homozygot

IFT	Intraflagellar Transport
kb	Kilobasen
Lit	Literatur
LJ	Lebensjahr
LMBBS	Laurence-Moon-Bardet-Biedl-Syndrom
LMS	Laurence-Moon-Syndrom
M	Molar
MKKS	McKusick-Kaufman-Syndrom
MR	Mentale Retardierung
n	Stichprobenumfang
N	Nierenveränderungen
nd	Nicht getestet
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NIDDM	non-insulin-dependent /nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus
OAT-Syndrom	Oligo-Asthen-Teratozoospermie-Syndrom
OGT	O-N-Acetylglucosamintransferase
Oligo(s)	Oligonukleotid(e)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PilF	Protein domain, involved in twitching mobility and type-IV pilus assembly
PP	postaxiale Polydaktylie
PTH1	B1 ist kodierendes Gen f. Parathormon (PTH)
R	Reverse
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
Rebase	Restriction Enzyme Database
RP	Retinitis pigmentosa
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSCA	Single-strand conformational analysis




Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	Polymerase isoliert aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCP	T-complex-related-proteins
TCP1-Chaperon	Chaperon des Typs II
TE	Tris-EDTA
TEMED p.a.	Tetramethyldiamid gelöst
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
TPR	Tetratricozeptid repeats
TRIM32	Tripartite motif-containing 32
TTC8	Tetratricozeptid-repeat-domain 8
U	Units
UCSC	University of California Santa Cruz
vs.	versus
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Symbole

Stammbaumsymbole

	männliche Person, nicht betroffen		männliche Person, am BBS erkrankt
	weibliche Person, nicht betroffen		weibliche Person, am BBS erkrankt

Symbole zur Beschreibung des Genotyps

	heterozygoter Träger der Mutation C377_F378delfsX412
	heterozygoter Träger der Mutation p.A447T
	heterozygote Trägerin der Mutation p.A447T

8. Literaturverzeichnis

- Al-Awadi SA, Moussa MA, Naguib KK, Farag TI, Teebi AS, el-Khalifa M, el-Dossary L (1985) Consanguinity among the Kuwaiti population. *Clin Genet* 27:483-486
- Ammann F (1970) Investigations clinique et genetique sur le syndrome de Bardet-Biedl en Suisse J *Genet Hum* 118:1-310
- Anadoliiska A, Roussinov D (1993) Clinical aspects of renal involvement in Bardet-Biedl syndrome. *Int Urol Nephrol* 25:509-514
- Andersen KL, Echwald SM, Larsen LH, Hamid YH, Glumer C, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Andersen T, Sorensen TI, Hansen T, Pedersen O (2004) Variation of the McKusick-Kaufman gene and large scale studies of relationships with common forms of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:225-30
- Ansley SJ, Badano JL, Blacque OE, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Kim JC, Ross AJ, Eichers ER, Teslovich TM, Mah AK, Johnsen RC, Cavender JC, Lewis RA, Leroux MR, Beales PL, Katsanis N (2003) Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 425:628-633
- Avidor-Reiss T, Maer AM, Koundakjian E, Polyanovsky A, Keil T, Subramaniam S, Zuker CS (2004) Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis. *Cell* 117:527-39
- Badano JL, Leitch CC, Ansley SJ, May-Simera H, Lawson S, Lewis RA, Beales PL, Dietz HC, Fisher S, Katsanis N (2006a) Dissection of epistasis in oligogenic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* 439:326-330
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006b) The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, vol.7, pp.125-148
- Badano JL, Ansley SJ, Leitch CC, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003a) Identification of a novel Bardet-Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am J Hum Genet* 72:650-658
- Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, Castellan C, Beales PL, Leroux MR, Katsanis N (2003b) Heterozygous mutations in *BBS1*, *BBS2* and *BBS6* have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum Mol Genet* 12:1651-1659
- Bardet G (1920) Sur un syndrome d'obesite infantile avec polydactylie et retinite pigmentaire (contribution a l'etude des formes cliniques de l'obesite hypophysaire). Thesis: Paris 479
- Barnett S, Reilly S, Carr L, Ojo I, Beales PL, Charman T (2002) Behavioural phenotype of Bardet-Biedl syndrome. *J Med Genet* 39:e76
- Beales PL (2006) Hedgehogs on the road to polarity. *Nat Genet* 38:277-279
- Beales PL (2005) Lifting the lid on Pandora's box: the Bardet-Biedl syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 15:315-323
- Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N (2003) Genetic interaction of *BBS1* mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 72:1187-1199

- Beales PL, Katsanis N, Lewis RA, Ansley SJ, Elcioglu N, Raza J, Woods MO, Green JS, Parfrey PS, Davidson WS, Lupski JR (2001) Genetic and mutational analyses of a large multiethnic Bardet-Biedl cohort reveal a minor involvement of *BBS6* and delineate the critical intervals of other loci. *Am J Hum Genet* 68:606-616
- Beales PL, Reid HA, Griffiths MH, Maher ER, Flint FA, Woolf AS (2000) Renal cancer and malformations in relatives of patients with Bardet-Biedl syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 15:1977-1985
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flint FA (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36:437-446
- Beales PL, Warner AM, Hitman GA, Thakker R, Flint FA (1997) Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J Med Genet* 34:92-98
- Bell J (1958) The Laurence-Moon syndrome. In: Penrose LS (ed) *The Treasury of Human Inheritance*. Cambridge University Press, UK, pp 51-96
- Bergsma DR and Brown KS (1975) Assessment of ophthalmologic, endocrinologic and genetic findings in the Bardet-Biedl syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11:132-6
- Biedl A (1922) Ein Geschwisterpaar mit adiposo-genitaler Dystrophie. *Dtsch. Med. Wschr.* 48
- Blacque OE, Reardon MJ, Li C, McCarthy J, Mahjoub MR, Ansley SJ, Badano JL, Mah AK, Beales PL, Davidson WS, Johnsen RC, Audeh M, Plasterk RH, Baillie DL, Katsanis N, Quarmby LM, Wicks SR, Leroux MR (2004) Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes Dev* 18:1630-1642
- Braun TA, Shankar SP, Davis S, O'Leary B, Scheetz TE, Clark AF, Sheffield VC, Casavant TL, Stone EM (2006) Prioritizing regions of candidate genes for efficient mutation screening. *Hum Mutat* 27:195-200
- Bruford EA, Riise R, Teague PW, Porter K, Thomson KL, Moore AT, Jay M, Warburg M, Schinzel A, Tommerup N, Tornqvist K, Rosenberg T, Patton M, Mansfield DC, Wright AF (1997) Linkage mapping in 29 Bardet-Biedl syndrome families confirms loci in chromosomal regions 11q13, 15q22.3-q23, and 16q21. *Genomics* 41:93-99
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48:137-144
- Burghes AH, Vaessin HE, de La Chapelle A (2001) Genetics. The land between Mendelian and multifactorial inheritance. *Science* 293:2213-2214
- Campo RV and Aaberg TM (1982) Ocular and systemic manifestations of the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Ophthalmol* 94:750-6
- Carmi R, Elbedour K, Wietzman D, Sheffield V, Shoham-Vardi I (1998) Lowering the burden of hereditary diseases in a traditional, inbred community: ethical aspects of genetic research and its application. *Sci Context* 11:391-395
- Carmi R, Elbedour K, Stone EM, Sheffield VC (1995) Phenotypic differences among patients with Bardet-Biedl syndrome linked to three different chromosome loci. *Am J Med Genet* 59:199-203
- Cassart M, Eurin D, Didier F, Guibaud L, Avni EF (2004) Antenatal renal sonographic anomalies and postnatal follow-up of renal involvement in Bardet-Biedl syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 24:51-54

- Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE, Nishimura DY, Braun TA, Kim KY, Huang J, Elbedour K, Carmi R, Slusarski DC, Casavant TL, Stone EM, Sheffield VC (2006) Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (*BBS11*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6287-6292
- Chiang AP, Nishimura D, Searby C, Elbedour K, Carmi R, Ferguson AL, Secrist J, Braun T, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2004) Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (*BBS3*). *Am J Hum Genet* 75:475-484
- Claus H, Frick B, Meyer J, Panzner G, Oeffner F, Koch MC (2007) *BBS1* and *BBS10* molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl- Syndrome. *Med Genetik* 19:64
- Claus H (2008), Mutationsanalysen in *BBS1* und *BBS10* bei Patienten mit dem Bardet-Biedl-Syndrom. Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Cramer B, Green J, Harnett J, Johnson GJ, McManamon P, Farid N, Pryse-Phillips W, Parfrey PS (1988) Sonographic and urographic correlation in Bardet-Biedl syndrome (formerly Laurence-Moon-Biedl syndrome). *Urol Radiol* 10:176-80
- Croft JB, Morrell D, Chase CL, Swift M (1995) Obesity in heterozygous carriers of the gene for the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 55:12-15
- Croft JB, Swift M (1990) Obesity, hypertension, and renal disease in relatives of Bardet-Biedl syndrome sibs. *Am J Med Genet* 36:37-42
- Dar P, Sachs GS, Carter SM, Ferreira JC, Nitowsky HM, Gross SJ (2001) Prenatal diagnosis of Bardet-Biedl syndrome by targeted second-trimester sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 17:354-356
- David A, Bitoun P, Lacombe D, Lambert JC, Nivelon A, Vigneron J, Verloes A (1999) Hydrometrocolpos and polydactyly: a common neonatal presentation of Bardet-Biedl and McKusick-Kaufman syndromes. *J Med Genet* 36:599-603
- Eichers ER, Abd-El-Barr MM, Paylor R, Lewis RA, Bi W, Lin X, Meehan TP, Stockton DW, Wu SM, Lindsay E, Justice MJ, Beales PL, Katsanis N, Lupski JR (2006) Phenotypic characterization of *BBS4* null mice reveals age-dependent penetrance and variable expressivity. *Hum Genet* 120(2):211-26
- Eichers ER, Lewis RA, Katsanis N, Lupski JR (2004) Triallelic inheritance: a bridge between Mendelian and multifactorial traits. *Ann Med* 36:262-272
- Elbedour K, Zucker N, Zalzstein E, Barki Y, Carmi R (1994) Cardiac abnormalities in the Bardet-Biedl syndrome: echocardiographic studies of 22 patients. *Am J Med Genet* 52:164-9
- Fan Y, Green JS, Ross AJ, Beales PL, Parfrey PS, Davidson WS (2005) Linkage disequilibrium mapping in the Newfoundland population: a re-evaluation of the refinement of the Bardet-Biedl syndrome 1 critical interval. *Hum Genet* 116:62-71
- Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Borojevich K, Ross AJ, Moore SJ, Badano JL, May-Simera H, Compton DS, Green JS, Lewis RA, van Haelst MM, Parfrey PS, Baillie DL, Beales PL, Katsanis N, Davidson WS, Leroux MR (2004a) Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 36:989-993
- Fan Y, Rahman P, Peddle L, Hefferton D, Gladney N, Moore SJ, Green JS, Parfrey PS, Davidson WS (2004b) Bardet-Biedl syndrome 1 genotype and obesity in the Newfoundland population. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:680-684
- Farag TI, Teebi AS (1988) Bardet-Biedl and Laurence-Moon syndromes in a mixed Arab population. *Clin Genet* 33:78-82

- Farag TI, Teebi AS (1989) High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin Genet* 36:463-464
- Fath MA, Mullins RF, Searby C, Nishimura DY, Wei J, Rahmouni K, Davis RE, Tayeh MK, Andrews M, Yang B, Sigmund CD, Stone EM, Sheffield VC (2005) *Mkks*-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 14:1109-1118
- Fausser S, Munz M, Besch D (2003) Further support for digenic inheritance in Bardet-Biedl syndrome. *J Med Genet* 40:e104
- Frick BS (2007), Zur Frage der Vererbung des Bardet-Biedl-Syndroms - Molekulargenetische Analysen in den Genen *BBS1* und *BBS6*. Dissertation Philipps-Universität Marburg.
- Fulton AB, Hansen RM, Glynn RJ (1993) Natural course of visual functions in the Bardet-Biedl syndrome. *Arch Ophthalmol* 111:1500-6
- Garstecki DC, Borton TE, Stark EW, Kennedy BT (1972) Speech, language, and hearing problems in the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *J Speech Hear Disord* 37:407-13
- Gershoni-Baruch R, Nachlieli T, Leibo R, Degani S, Weissman I (1992) Cystic kidney dysplasia and polydactyly in 3 sibs with Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 44:269-273
- Ghadami M, Tomita HA, Najafi MT, Damavandi E, Farahvash MS, Yamada K, Majidzadeh AK, Niikawa N (2000) Bardet-Biedl syndrome type 3 in an Iranian family: clinical study and confirmation of disease localization. *Am J Med Genet* 94:433-437
- Green JS, Parfrey PS, Harnett JD, Farid NR, Cramer BC, Johnson G, Heath O, McManamon PJ, O'Leary E, Pryse-Phillips W (1989) The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 321:1002-1009
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 5:111-117
- Hanig RV, Jr., Carlson IH, Gilbert EF, Shapiro SS, Opitz JM (1980) Virilism as a late manifestation in the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 7:279-292
- Harnett JD, Green JS, Cramer BC, Johnson G, Chafe L, McManamon P, Farid NR, Pryse-Phillips W, Parfrey PS (1988) The spectrum of renal disease in Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med* 319:615-618
- Harper PS (2005) Julia Bell and the Treasury of Human Inheritance. *Hum Genet* 116:422-432
- Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2:338-346
- Heon E, Westall C, Carmi R, Elbedour K, Panton C, Mackeen L, Stone EM, Sheffield VC (2005) Ocular phenotypes of three genetic variants of Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet A* 132:283-287
- Hoskins BE, Thorn A, Scambler PJ, Beales PL (2003) Evaluation of multiplex capillary heteroduplex analysis: a rapid and sensitive mutation screening technique. *Hum Mutat* 22:151-157
- Hurley RM, Dery P, Norady MB, Drummond KN (1975) The renal lesion of the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *J Pediatr* 87:206-9
- Iannaccone A, Mykytyn K, Persico AM, Searby CC, Baldi A, Jablonski MM, Sheffield VC (2005) Clinical evidence of decreased olfaction in Bardet-Biedl syndrome caused by a deletion in the *BBS4* gene. *Am J Med Genet A* 132:343-346
- Karmous-Benailly H, Martinovic J, Gubler MC, Sirot Y, Clech L, Ozilou C, Auge J, et al. (2005) Antenatal presentation of Bardet-Biedl syndrome may mimic Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* 76:493-504

- Katsanis N (2004) The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R65-71
- Katsanis N, Eichers ER, Ansley SJ, Lewis RA, Kayserili H, Hoskins BE, Scambler PJ, Beales PL, Lupski JR (2002) *BBS4* is a minor contributor to Bardet-Biedl syndrome and may also participate in triallelic inheritance. *Am J Hum Genet* 71:22-29
- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR (2001a) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293:2256-2259
- Katsanis N, Lupski JR, Beales PL (2001b) Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 10:2293-2299
- Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR (2000) Mutations in *MKKS* cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:67-70
- Katsanis N, Lewis RA, Stockton DW, Mai PM, Baird L, Beales PL, Leppert M, Lupski JR (1999) Delineation of the critical interval of Bardet-Biedl syndrome 1 (*BBS1*) to a small region of 11q13, through linkage and haplotype analysis of 91 pedigrees. *Am J Hum Genet* 65:1672-1679
- Kim JC, Badano JL, Sibold S, Esmail MA, Hill J, Hoskins BE, Leitch CC, Venner K, Ansley SJ, Ross AJ, Leroux MR, Katsanis N, Beales PL (2004) The Bardet-Biedl protein *BBS4* targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 36:462-470
- Klein D (1968) Diverse clinical and genetic varieties of the Bardet-Biedl syndrome. *Rev Otonuroophthalmol* 40:125-44
- Klein D, Ammann F (1969) The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland. Clinical, genetic and epidemiological studies. *J Neurol Sci* 9:479-513
- Kozlowski P, Krzyzosiak WJ (2005) Structural factors determining DNA length limitations in conformation-sensitive mutation detection methods. *Electrophoresis* 26:71-81
- Kozlowski P, Krzyzosiak WJ (2004) Optimum sample medium for single-nucleotide polymorphism and mutation detection by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 25:990-998
- Kulaga HM, Leitch CC, Eichers ER, Badano JL, Lesemann A, Hoskins BE, Lupski JR, Beales PL, Reed RR, Katsanis N (2004) Loss of *BBS* proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet* 36:994-998
- Kwitek-Black AE, Carmi R, Duyk GM, Buetow KH, Elbedour K, Parvari R, Yandava CN, Stone EM, Sheffield VC (1993) Linkage of Bardet-Biedl syndrome to chromosome 16q and evidence for non-allelic genetic heterogeneity. *Nat Genet* 5:392-396
- Laurence JZ, Moon RC (1866) Four cases of "retinitis pigmentosa" occurring in the same family, and accompanied by general imperfections of development. *Ophthalmol Rev* 2:32-41
- Laurier V, Stoetzel C, Muller J, Thibault C, Corbani S, Jalkh N, Salem N, Chouery E, Poch O, Licaire S, Danse JM, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Megarbane A, Mandel JL, Dollfus H (2006) Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet-Biedl syndrome family with two mutant genes (*BBS2*, *BBS10*), three mutations, but no triallelism. *Eur J Hum Genet* 14 (11):1195-203
- Leppert M, Baird L, Anderson KL, Otterud B, Lupski JR, Lewis RA (1994) Bardet-Biedl syndrome is linked to DNA markers on chromosome 11q and is genetically heterogeneous. *Nat Genet* 7:108-112

- Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Leroux MR, Davidson WS, Beales PL, Guay-Woodford LM, Yoder BK, Stormo GD, Katsanis N, Dutcher SK (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the *BBS5* human disease gene. *Cell* 117:541-552
- Lorda-Sanchez I, Ayuso C, Sanz R, Ibanez A (2001) Does Bardet-Biedl syndrome have a characteristic face? *J Med Genet* 38:E14
- McLoughlin TG and Shanklin DR (1967) Pathology of Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome. *J Pathol Bacteriol* 93:65-79
- Mehrotra N, Taub S, Covert RF (1997) Hydrometrocolpos as a neonatal manifestation of the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 69:220
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215
- Moore SJ, Green JS, Fan Y, Bhogal AK, Dicks E, Fernandez BA, Stefanelli M, Murphy C, Cramer BC, Dean JC, Beales PL, Katsanis N, Bassett AS, Davidson WS, Parfrey PS (2005) Clinical and genetic epidemiology of Bardet-Biedl syndrome in Newfoundland: a 22-year prospective, population-based, cohort study. *Am J Med Genet A* 132:352-360
- Myktytn K, Mullins RF, Andrews M, Chiang AP, Swiderski RE, Yang B, Braun T, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2004a) Bardet-Biedl syndrome type 4 (*BBS4*)-null mice implicate *Bbs4* in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8664-8669
- Myktytn K, Sheffield VC (2004b) Establishing a connection between cilia and Bardet-Biedl Syndrome. *Trends Mol Med* 10:106-109
- Myktytn K, Nishimura DY, Searby CC, Beck G, Bugge K, Haines HL, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Iannaccone A, Jacobson SG, Weleber RG, Wright AF, Riise R, Hennekam RC, Luleci G, Berker-Karauzum S, Biesecker LG, Stone EM, Sheffield VC (2003) Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (*BBS1*). *Am J Hum Genet* 72:429-437
- Myktytn K, Nishimura DY, Searby CC, Shastri M, Yen HJ, Beck JS, Braun T, Streb LM, Cornier AS, Cox GF, Fulton AB, Carmi R, Luleci G, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Jacobson SG, Heckenlively JR, Weleber RG, Stone EM, Sheffield VC (2002) Identification of the gene (*BBS1*) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome. *Nat Genet* 31:435-438
- Myktytn K, Braun T, Carmi R, Haider NB, Searby CC, Shastri M, Beck G, Wright AF, Iannaccone A, Elbedour K, Riise R, Baldi A, Raas-Rothschild A, Gorman SW, Duhl DM, Jacobson SG, Casavant T, Stone EM, Sheffield VC (2001) Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome *BBS4*. *Nat Genet* 28:188-191
- Nadjmi B, Flanagan MJ, Christian JR (1969) Laurence-Moon-Biedl syndrome, associated with multiple genitourinary tract anomalies. *Am J Dis Child* 117:352-6
- Nakamura F, Sasaki H, Kajihara H, Yamanoue M (1990) Laurence-Moon-Biedl syndrome accompanied by congenital hepatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 5:206-10
- Nishimura DY, Swiderski RE, Searby CC, Berg EM, Ferguson AL, Hennekam R, Merin S, Weleber RG, Biesecker LG, Stone EM, Sheffield VC (2005) Comparative genomics and gene expression analysis identifies *BBS9*, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *Am J Hum Genet* 77:1021-1033

- Nishimura DY, Fath M, Mullins RF, Searby C, Andrews M, Davis R, Andorf JL, Mykytyn K, Swiderski RE, Yang B, Carmi R, Stone EM, Sheffield VC (2004) Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16588-16593
- Nishimura DY, Searby CC, Carmi R, Elbedour K, Van Maldergem L, Fulton AB, Lam BL, Powell BR, Swiderski RE, Bugge KE, Haider NB, Kwitek-Black AE, Ying L, Duhl DM, Gorman SW, Heon E, Iannaccone A, Bonneau D, Biesecker LG, Jacobson SG, Stone EM, Sheffield VC (2001) Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet-Biedl syndrome (BBS2). *Hum Mol Genet* 10:865-874
- O'Dea DF, Murphy SW, Hefferton D, Parfrey PS (1998) Higher risk for renal failure in first-degree relatives of white patients with end-stage renal disease: a population-based study. *Am J Kidney Dis* 32:794-801
- Parfrey PS, Davidson WS, Green JS (2002) Clinical and genetic epidemiology of inherited renal disease in Newfoundland. *Kidney Int* 61:1925-1934
- Pazour GJ, Rosenbaum JL (2002) Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol* 12:551-555
- Riise R, Tornqvist K, Wright AF, Mykytyn K, Sheffield VC (2002) The phenotype in Norwegian patients with Bardet-Biedl syndrome with mutations in the *BBS4* gene. *Arch Ophthalmol* 120:1364-1367
- Riise R, Andreasson S, Borgstrom MK, Wright AF, Tommerup N, Rosenberg T, Tornqvist K (1997) Intrafamilial variation of the phenotype in Bardet-Biedl syndrome. *Br J Ophthalmol* 81:378-38
- Ross AJ, May-Simera H, Eichers ER, Kai M, Hill J, Jagger DJ, Leitch CC, Chapple JP, Munro PM, Fisher S, Tan PL, Phillips HM, Leroux MR, Henderson DJ, Murdoch JN, Copp AJ, Eliot MM, Lupski JR, Kemp DT, Dollfus H, Tada M, Katsanis N, Forge A, Beales PL (2005) Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* 37:1135-1140
- Rudling O, Riise R, Tornqvist K, Jonsson K (1996) Skeletal abnormalities of hands and feet in Laurence-Moon-Bardet-Biedl (LMBB) syndrome: a radiographic study. *Skeletal Radiol* 25:655-60
- Runge P, Calver D, Marshall J, Taylor D (1986) Histopathology of mitochondrial cytopathy and the Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Br J Ophthalmol* 70:782-96
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467
- Schachat AP, Maumenee IH (1982) Bardet-Biedl syndrome and related disorders. *Arch Ophthalmol* 100:285-288
- Sheffield VC (2004) Use of isolated populations in the study of a human obesity syndrome, the Bardet-Biedl syndrome. *Pediatr Res* 55:908-911
- Sheffield VC, Nishimura D, Stone EM (2001) The molecular genetics of Bardet-Biedl syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 11:317-321
- Sheffield VC, Carmi R, Kwitek-Black A, Rokhlina T, Nishimura D, Duyk GM, Elbedour K, Sunden SL, Stone EM (1994) Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 3:1331-1335

- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332
- Slavotinek A, Biesecker LG (2003) Genetic modifiers in human development and malformation syndromes, including chaperone proteins. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R45-50
- Slavotinek AM, Stone EM, Mykityn K, Heckenlively JR, Green JS, Heon E, Musarella MA, Parfrey PS, Sheffield VC, Biesecker LG (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 26:15-16
- Solis-Cohen S, Weiss E (1925) Dystrophia adiposogenitalis with atypical retinitis pigmentosa and mental deficiency: the Laurence-Biedl syndrome. *Am J Med Sci* 169:489-505
- Srinivas V, Winsor GM, Dow D (1983) Urologic manifestations of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *Urology* 21:581-3
- Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghloul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P, Hamel C, de Ravel TJ, Lewis RA, Friederich E, Thibault C, Danse JM, Verloes A, Bonneau D, Katsanis N, Poch O, Mandel JL, Dollfus H (2007) Identification of a novel BBS gene (*BBS12*) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 80:1-11
- Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, Leitch CC, et al. (2006a) *BBS10* encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38:521-524
- Stoetzel C, Laurier V, Faivre L, Megarbane A, Perrin-Schmitt F, Verloes A, Bonneau D, Mandel JL, Cossee M, Dollfus H (2006b) *BBS8* is rarely mutated in a cohort of 128 Bardet-Biedl syndrome families. *J Hum Genet* 51:81-84
- Stoler JM, Herrin JT, Holmes LB (1995) Genital abnormalities in females with Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet* 55:276-278
- Stone DL, Slavotinek A, Bouffard GG, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Barr M, Biesecker LG (2000) Mutation of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick-Kaufman syndrome. *Nat Genet* 25:79-82
- Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1991) Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Anal Biochem* 192:82-84
- Temtamy SA, McKusick VA (1978) The genetics of hand malformations. *Birth Defects Orig Artic Ser* 14:i-xviii, 1-619
- Uguralp S, Demircan M, Cetin S, Sigirci A (2003) Bardet-Biedl syndrome associated with vaginal atresia: a case report. *Turk J Pediatr* 45:273-5
- Woods MO, Young TL, Parfrey PS, Hefferton D, Green JS, Davidson WS (1999) Genetic heterogeneity of Bardet-Biedl syndrome in a distinct Canadian population: evidence for a fifth locus. *Genomics* 55:2-9
- Yen HJ, Tayeh MK, Mullins RF, Stone EM, Sheffield VC, Slusarski DC (2006) Bardet-Biedl syndrome genes are important in retrograde intracellular trafficking and Kupffer's vesicle cilia function. *Hum Mol Genet* 15:667-677
- Young TL, Woods MO, Parfrey PS, Green JS, Hefferton D, Davidson WS (1999) A founder effect in the newfoundland population reduces the Bardet-Biedl syndrome I (*BBS1*) interval to 1 cM. *Am J Hum Genet* 65:1680-1687

- Young TL, Woods MO, Parfrey PS, Green JS, O'Leary E, Hefferton D, Davidson WS (1998) Canadian Bardet-Biedl syndrome family reduces the critical region of *BBS3* (3p) and presents with a variable phenotype. *Am J Med Genet* 78:461-467
- Zhang Q, Murcia NS, Chittenden LR, Richards WG, Michaud EJ, Woychik RP, Yoder BK (2003) Loss of the Tg737 protein results in skeletal patterning defects. *Dev Dyn* 227:78-90
- Zhu S, Gerhard DS (1998) A transcript map of an 800-kb region on human chromosome 11q13, part of the candidate region for SCA5 and *BBS1*. *Hum Genet* 103:674-680
- Ziemssen F, Schnepf R, Pfeiffer A (2001) [SSCP (single strand conformation polymorphism) analysis for detection of point mutations. A technique and its limits exemplified by dominantly inherited forms of diabetes (MODY)]. *Med Klin (Munich)* 96:515-5209

9. Anhang

9.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

9.1.1 Philipps-Universität Marburg

Arnold	Gudermann	Lohoff	Röhm
Aumüller			
	Hasilik	Maier	Schäfer
Basler	Hofmann	Maisch	Schmidt
Baum		Mandrek	Schrader
Bertalanffy	Jungclas	Moll	Seitz
Bien		Moosdorf	Sommer
	Kalder	Mueller	Steininger
Cetin	Klenk	Müller	Strauch
Czubayko	Klose	Mutters	Sure
	Koch		
Daut	Koolmann	Neubauer	Vogelmeier
	Krause		
Eilers	Kretzschmer	Oertel	Wagner
	Krieg		Weihe
Feuser	Kroll	Radsak	Weiler
		Remschmidt	Werner
Gotzen	Lang	Renz	Westermann
Griss	Lill	Rieder	Wulf
Grzeschik	Löffler	Rothmund	

9.1.2 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Hofmann	Röpke	Zaage
Kaltwaßer	Scheler	
Langer	Thomssen	
Nietsch	Willenbrock	

9.2 Lebenslauf

Name: Julia Meyer geb. Kersten
 Geburtsdatum/-ort: 16.07.1979, Moers
 Anschrift: Eichendorffstr. 17
 06114 Halle/S.
 Familienstand: verheiratet, 1 Kind

 Schulbildung:
 1986-1990 Grundschule, Duisburg-Baerl
 1990-1999 Gymnasium Adolfinum, Moers mit Abschluss Abitur

 Universität:
 2000-2006 Studium der Humanmedizin,
 Philipps-Universität Marburg (2000-2005)
 und Martin-Luther-Universität Halle (2005-2006)

 2002 Physikum
 2003 1. Staatsexamen
 2003-2004 Promotionsarbeit am Zentrum für Humangenetik
 der Philipps-Universität Marburg,
 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Manuela C. Koch
 2005 2. Staatsexamen
 2005-2006 Praktisches Jahr
 Klinik f. Gynäkologie und Geburtshilfe der MLU Halle,
 Klinik f. Allgemeinchirurgie BG Bergmannstrost, Halle/S.
 Klinik für Innere Medizin (Abt. Kardiologie) Elisabeth
 Krankenhaus Halle/S.
 2006 3. Staatsexamen MLU Halle

 seit 09/2006 Assistenzärztin in der Klinik für Geburtshilfe und
 Reproduktionsmedizin der MLU Halle-Wittenberg

Marburg, im Frühjahr 2009

9.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. K.-H. Grzeschik danke ich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit am Zentrum für Humangenetik in Marburg anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Manuela C. Koch, die mich bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift mit großer Geduld betreute und mir in allen fachlichen Fragen stets zur Seite stand.

Frau Daniela Lerche und Frau Gerda Panzner danke ich sehr für die Einweisung und Hilfe bei der Einarbeitung in die Methoden sowie den angenehmen, freundschaftlichen und liebevollen Umgang während dieser Arbeit im Labor. Im Weiteren möchte ich mich bei Frau Dorothea Bornholdt bedanken, die durch ihr wertvollen Anregungen und Hinweise sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Kai Nagel, Herrn Benjamin Frick und Frau Helene Claus möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bedanken. Herrn Frank Oeffner danke ich für die gute Vorarbeit zum BBS-Thema.

Ich danke allen an dieser Studie teilnehmenden BBS-Patienten sowie ihren Familien. Insbesondere Frau Kellermann von der Selbsthilfeorganisation Pro Retina Deutschland e.V. sei für ihr besonderes Engagement diese Studie betreffend gedankt.

Meinen Eltern und Schwiegereltern sowie meiner Schwester Susanne und ihrem Mann Edy möchte ich für die unermüdliche Unterstützung während dieser Jahre danken. Sie haben mich in allen Umbrüchen und Veränderungen gestärkt und mir vieles möglich gemacht, das ohne ihre Hilfe und den ständigen Glauben an meine Fähigkeiten nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Achim für seine Geduld in anstrengenden Zeiten der Vielfachbelastungen und die Begleitung und Stärkung während dieser entscheidenden Lebensphase.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Mutationsanalysen in *BBS1* bei Patienten mit Bardet-Biedl-Syndrom“

im Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Professor Dr. med. Manuela C. Koch selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die vorliegende Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule zur Zulassung eingereicht noch diene sie sonstigen Prüfungszwecken.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Form veröffentlicht:

Claus H., Frick B., Meyer J., Panzner G., Oeffner F., Koch M.C. (2007) *BBS1* and *BBS10* molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome. *Medizinische Genetik* 19:64; Poster bei der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik in Bonn 7.-10. März 2007 (Abb. 27)


Ort:

Datum:

Unterschrift:

(Julia Meyer)


9.4.1 Poster



BBS1 and BBS10 molecular genetic analyses in 80 patients with Bardet-Biedl Syndrome

Claus H., Frick B., Meyer J., Panzner G., Oeffner F., Koch M.C.

Zentrum für Humangenetik, Philipps-Universität Marburg, Germany
Contact: helene.claus@gmx.de; koch2@staff.uni-marburg.de



Introduction:

The autosomal recessively inherited Bardet-Biedl syndrome (BBS, OMIM 209900) is a disorder affecting primary cilia and microtubule-based structures arising from the basal body. These cell structures are involved as mechanosensors in kidney, epithelium, photoreceptor cells of the retina and in the developmental phenomenon of planar cell polarity (Fig. 1). The syndrome is phenotypically characterized by postaxial polydactyly, retinopathy, obesity, hypogonadism in males, renal dysfunction and variable mental deficiency (Table 1).

Over the past years it has become obvious that BBS is genetically heterogeneous with several genes (*BBS1*-*BBS12*) involved (Table 2). Molecular analyses have shown that some individuals need mutations in more than one *BBS* locus for clinical manifestation. Therefore BBS is currently regarded as a disorder with digenic or even oligogenic inheritance.

Most mutations are private mutations in the respective individual and his family. Uptil now only two mutations occur more frequently and are present in different populations. In the European population the *BBS1* mutation p.Met390Arg is observed in about 18% of individuals with BBS, whereas it is infrequent in the Turkish population. A second major locus is *BBS10* in which the mutation p.Cys91LeufsX5 was found in 13% of individuals in different ethnicities.

Table 1: Diagnostic criteria for BBS according to Beales et al. 1999

Primary features	Secondary features
• Cone-rod dystrophy	• Speech disorder
• Postaxial polydactyly	• Strabismus / cataracts / astigmatism
• Truncal Obesity	• Brachydactyly / syndactyly
• Mental deficiency	• Developmental delay
• Hypogonadism in males	• Nephrogenic diabetes insipidus
• Renal dysfunction	• Axial/ poor coordination
	• Mild hypertension
	• Diabetes mellitus
	• Dental crowding
	• Cardiovascular anomalies
	• Hepatic involvement

Table 2: BBS genes and their putative proteins

Gene	Recognized domains	Cellular localisation	Putative function
<i>BBS1</i>	— (Sto-bladed β-propeller-region)	Basal body/cilium	Cilia function
<i>BBS2</i>	— (Sto-bladed β-propeller-region)	Basal body/cilium	Cilia function, flagellum formation
<i>BBS3/ARL6</i>	GTP-binding	Basal body/cilium	Vesicle trafficking
<i>BBS4</i>	TPRP/FPF	Pericentriolar/basal body	Adapter protein for IFT and cilia function
<i>BBS5</i>	DM16/DUF1448	Basal body/cilium	Cilia function, flagellum formation
<i>BBS6/ANKK5</i>	TCF1-chaperonin	Pericentriolar/basal body	Microtubule-dependent membrane trafficking
<i>BBS7</i>	TPRP/FPF (Sto-bladed β-propeller-region)	Basal body/cilium	IFT particle assembly
<i>BBS8/ITIC8</i>	TPRP/FPF	Pericentriolar region	IFT particle assembly
<i>BBS9/B1</i>	PTH61	Cilium	unknown
<i>BBS10</i>	C12orf58	Pericentriolar/basal body	unknown
<i>BBS11/ITIM22</i>	E3 ubiquitin ligase	Interacts with BBS1 and BBS9	unknown
<i>BBS12</i>	Type II chaperonin	unknown	Interaction with BBS6 and BBS10

Results and Conclusion:

We screened a sample of 80 BBS patients for the *BBS1* mutation p.Met390Arg (c.1169T>G) and for the *BBS10* mutation p.Cys91LeufsX5 (c.270_271insT). The mutation p.Met390Arg was found in 14% of German but not in any Turkish patients. In addition, we detected in *BBS1* five unique mutations in different families: a 50bp insertion in exon 12 (p.Cys377TTPfaX19), a deletion of exons 12+13 (c.Ex12_Ex13del), and three point mutations (c.1318C>T, p.Arg440X; c.1336G>A, p.Ala447Thr; c.1660A>T, p.Ser554Cys). In *BBS6* only two point mutations were found (Table 4). The mutation p.Cys91LeufsX5 was found in 29% of German and in 8% of Turkish patients. Additionally we observed in *BBS10* a combined 1 bp insertion and point mutation: c.[253_254insA_254C>G], p.Thr85LysfsX11.

In summary, the mutations p.Met390Arg and p.Cys91LeufsX5 were detected in 43% of German patients (Table 3). Therefore, this limited and low cost molecular test is helpful to support the clinical diagnosis of BBS in our population. The variant p.Cys91LeufsX5 is the most prevalent mutation in German BBS patients and outnumbers p.Met390Arg threefold. Table 4 summarizes the results of the detected mutations in *BBS1*, *BBS6* and *BBS10*. There cannot be found any prove for these loci to be involved in digenic or oligogenic inheritance.

Table 3: Frequency of mutations in *BBS1*, *BBS6* and *BBS10* in the study group

	Germany		Turkey		others		all	
	patients	alleles	patients	alleles	patients	alleles	patients	alleles
WTip.Met390Arg	2/56	2/112	0/12	0/24	0/9	0/18	2/77	2/154
	3.57%	1.79%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.60%	1.30%
p.Met390Arg/p.Met390Arg	6/56	12/112	0/12	0/24	0/9	0/18	6/77	12/154
	10.71%	10.71%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	7.79%	7.79%
Carriers of p.Met390Arg	8/56	14/112	0/12	0/24	0/9	0/18	8/77	14/154
	14.29%	12.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	10.39%	9.09%
WTip.Cys91LeufsX5	7/56	7/112	0/12	0/24	0/9	0/18	7/77	7/156
	12.50%	6.25%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.97%	4.49%
p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5	9/56	18/112	1/13	2/26	0/9	0/18	10/78	18/152
	16.07%	16.07%	7.69%	7.69%	0.00%	0.00%	12.82%	11.84%
Carriers of p.Cys91LeufsX5	16/56	25/112	1/13	2/26	0/9	0/18	17/78	27/156
	28.57%	22.32%	7.69%	7.69%	0.00%	0.00%	21.79%	17.31%
Carriers of p.Met390Arg or p.Cys91LeufsX5	24/56	39/112	1/13	2/26	0/9	0/18	25/78	41/156
	42.86%	34.82%	7.69%	7.69%	0.00%	0.00%	32.05%	26.28%
other mutations in <i>BBS1</i>	2/53	3/106	2/13	3/26	0/8	0/12	4/72	6/144
	3.77%	2.83%	15.38%	11.54%	0.00%	0.00%	5.56%	4.17%
Mutations in <i>BBS6</i>	2/54	4/108	0/8	0/16	0/0	0/0	2/62	4/122
	3.70%	3.70%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.23%	3.28%
other mutations in <i>BBS10</i>	1/54	1/108	0/13	0/26	0/9	0/18	1/76	1/152
	1.85%	0.93%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.32%	0.66%
Carriers of mutations in <i>BBS1</i> , <i>BBS6</i> or <i>BBS10</i>	29/56	47/112	3/13	5/26	0/9	0/18	32/78	52/156
	51.79%	41.96%	23.08%	19.23%	0.00%	0.00%	41.03%	33.33%

Figure 1: Schematic representation of the putative localisation of BBS proteins according to Beales et al. 2005

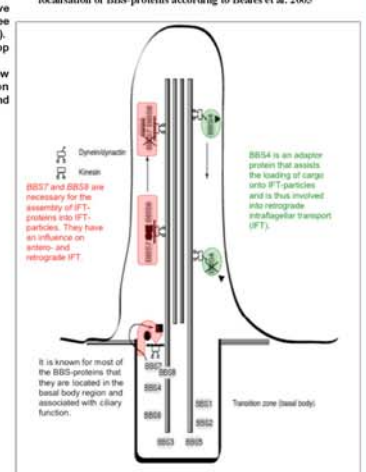


Table 4: Mutations detected in 32 BBS patients

patients	<i>BBS1</i> -Genotype	<i>BBS6</i> -Genotype	<i>BBS10</i> -Genotype
2	WTip.Met390Arg	WT/WT	WT/WT
7	p.Met390Arg/p.Met390Arg	WT/WT	WT/WT
1	p.Cys377TTPfaX19/p.Ala447Thr	WT/WT	WT/WT
1	WTip.Arg440X	WT/WT	WT/WT
1	WTip.Ser554Cys	WT/WT	WT/WT
1	c.Ex12_Ex13del/c.Ex12_Ex13del	WT/WT	WT/WT
7	WT/WT	WT/WT	WTip.Cys91LeufsX5
9	WT/WT	WT/WT	p.Cys91LeufsX5/p.Cys91LeufsX5
1	WT/WT	WT/WT	WTip.Thr85LysfsX11
1	WT/WT	p.[Gly532Val/p.[Gly532Val]p.[Trp37Cys]	WT/WT
1	WT/WT	p.[Trp37Cys/p.[Trp37Cys]p.[Gly532Val/p.[Gly532Val]	WT/WT

Methods:

BBS1: Reference Sequence: accession number NM_024648.4
Mutational analysis: p.Met390Arg: AwaI-restriction enzyme digestion of amplified PCR-product (exon 12)
Further mutational analysis: SSCA of exons 4, 5, 7-10, 12, 13, 15 and 16 (12% polyacrylamide gel at 10° C and 12° C) and sequencing of aberrant SSCA-fragments

BBS6: Reference Sequence: accession number AF_221993.1
Mutational analysis: SSCA of exons 3-6 (12% polyacrylamide gel at 10° C and 12° C) and sequencing of aberrant SSCA-fragments

BBS10: Reference Sequence: accession number NM_024685.2
Mutational analysis for p.Cys91LeufsX5 and other mutations: direct sequencing of exon 2

Acknowledgments:

We thank the patients and the organization PRO RETINA for their constant support and participation in the study. We also thank the referring clinicians for supplying clinical data.

References:

Beales et al. (1999) J Med Genet 36:437-446
Beales (2005) Curr Opin Genet & Develop 15:315-323
Chiang et al. (2006) PNAS 103:6297-6292
Katsani (2004) Hum Mol Genet 13:955-971
Nishimura et al. (2005) Am J Hum Genet 77:1021-1033
Shibata et al. (2006) Nature Genet 38:521-533
Shibata et al. (2007) Am J Hum Genet 80:1-11

Abb. 27: Dieses Poster wurde auf der 18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Bonn veröffentlicht (Medizinische Genetik 19:64 (2007)).